

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**Efecto del proceso de criopreservación sobre las
proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de
espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar al grado académico de doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Nadia Milagro Canorio Pariona

Lima – Perú

2015

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Dios, quien con su infinita bondad nos brindó el regalo más lindo, el don de la vida.

Asimismo, quisiera agradecer a mi familia, a mi esposo Fernando gracias por apoyarme y guiarme cuando más lo necesitaba, por entenderme y aconsejarme, por tu paciencia apoyo y amor, gracias por estar a mi lado. A mis queridas Bianca y Diana, ustedes son el motivo para poder avanzar y poder cumplir con los retos que me he planteado, gracias por sus sonrisas y sus aplausos, por su cariño y amor.

A mis padres, Javier y Redina, por apoyarme siempre, por todo el sacrificio que han hecho por mí. A mis hermanos: Elvia, Ricardo, Marco, Roberto y Mary, cada uno aportó siempre un lado diferente de cómo ver la vida y sus situaciones.

Un especial y profundo agradecimiento a la Mag. Martha Valdivia, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me ingreso al maravilloso mundo de la investigación, me brindó su apoyo, confianza y su amistad para poder realizar esta tesis dentro de proyectos de biotecnología en alpaca.

Un infinito agradecimiento al Dr. Pablo Ramírez, quien me asesoró en el desarrollo y redacción de esta tesis, gracias por sus consejos, apoyo y su amistad.

A Ivonne Fanny Reyes Mandujano, quien es una gran persona, sus aportes y consejos siempre fueron de ayuda para mí.

A mis grandes amigos Luis Tataje y Alejandro Florentini quienes me ayudaron y guiaron para desarrollar la tesis.

Un especial agradecimiento al Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) quienes mediante el contrato de subvención No 093-2013- CONCYTEC- FONDECYT, me brindaron el financiamiento para realizar los estudios de posgrado y desarrollar el trabajo de tesis.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia: Fernando Bianca y Diana, gracias por todo el amor que me brindan, por su apoyo y consejos, gracias por todas las horas sacrificadas en las cuales siempre me brindaban su comprensión.

ÍNDICE

	Pág.
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Summary	x
Introducción	1
II.-Antecedentes	3
1.Camelidos sudamericanos: la alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	3
1.1.-Fisiología reproductiva del macho de la alpaca	4
1.2.-El espermatozoide	5
1.3.-Características del semen, espermatozoide y espermatogénesis en individuos machos de alpaca	7
2.-Criopreservación de espermatozoides en la técnica de reproducción asistida	9
2.1.-Efecto de la criopreservación sobre la motilidad espermática	10
2.2.-Efecto de la criopreservación sobre la membrana plasmática	12
2.3.-Efecto de la criopreservación sobre el acrosoma	12
3.-Criopreservación de espermatozoides de alpaca	13
4.-Las enzimas antioxidantes y su acción frente al proceso de criocapacitación de espermatozoides	14
III.- Hipótesis	18
IV.- Objetivos	18
4.1.-Objetivo general	18
4.2.-Objetivos específicos	18
V.-Materiales	19
5.1.-Material biológico	19
5.2.-Material Químico	19
5.3.-Material de Vidrio y Plástico	21
5.4.-Equipos	22
VI.-Métodos	24
6.1.-Diseño experimental	24

	Pág.
6.2.-Análisis de la calidad de los espermatozoides pre y post congelamiento mediante el uso de pruebas de rutina y pruebas funcionales	25
6.2.1.-Medición de la concentración	25
6.2.2.-Evaluación de la movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática iniciales	26
6.3.-Proceso de criopreservación de los espermatozoides.	27
6.4.-Análisis de la inmunolocalización intracelular de las proteínas GPx1 y GPx4	30
6.5- Detección de las proteínas GPx1 y GPx4 mediante Electroforesis SDS Page y Western Blot	31
6.6.-Análisis de la expresión molecular del gen GPx4	32
6.6.1.-Colecta de muestra biológica	32
6.6.2.-Extracción del ácido ribonucleico (ARN):	32
6.6.3.-Diseño de iniciadores.	33
6.6.4.-Formación del ácido desoxirribonucleico codificante (ADNc) y el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR):	33
6.6.5.- Cuantificación relativa del gen GPx4	34
6.7.-Análisis estadístico.	37
VII.-Resultados	39
7.1.- Análisis de la calidad de los espermatozoides pre y post congelamiento mediante el uso de pruebas de rutina y pruebas funcionales	39
7.2.-Análisis de la localización intracelular de las proteínas Glutation peroxidasa 1 y 4 (GPx1 y GPx4)	39
7.3.-Análisis del estado de las proteínas Glutation peroxidasa 1 y 4 (GPx1 y GPx4)	43
7.4.- Cuantificación de los niveles de expresión a nivel transcripcional del gen GPx4.	46
VIII.-Discusión de resultados	51
IX.-Conclusiones	57
X.-Recomendaciones	57

	Pág
XI.-Referencias bibliográficas	58
XII.-Anexo	70

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACP. Agente crioprotector
- BSA. Albúmina sérica bovina
- DEPC: Dietilpirocarbonato
- DMA. Dimetilacetamida
- DNA: Sigla en inglés del ácido desoxirribonucleico
- DPBS. Medio Buffer Fosfato Salino Dulbecco`s
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína
- Gpx1: Glutation peroxidasa 1
- Gpx4: Glutation peroxidasa 4
- HAM F10. Medio HAM F10
- HCl. Ácido clorhídrico
- INEI: Instituto Nacional de Estadística e Informática
- kDa. KiloDalton
- Min. Minuto (s)
- mOsm. Miliosmoles
- NaCl. Cloruro de sodio
- PBS. Buffer fosfato salino
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- Q-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real.
- RNA: Sigla en inglés del ácido ribonucleico
- RPM. Revoluciones por minuto
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RESUMEN

Actualmente se han desarrollado trabajos sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca, demostrando disminución en los parámetros de viabilidad, motilidad e integridad de la membrana plasmática luego del proceso de descongelación, debido principalmente a especies de oxígeno reactivas producidas durante el proceso de congelamiento.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 y GPX4 de espermatozoides del epidídimo de alpaca, usamos muestras (n: 30) de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, se usó un método de congelamiento lento usando dimetilacetamida (0,375 M) como agente crioprotector, analizamos los parámetros de la motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática antes y después del proceso de congelamiento; así mismo evaluamos los extractos de proteínas de espermatozoides antes y después del congelamiento para evaluar el estado de estas proteínas mediante Western blott, la evaluación de la localización intracelular de estas proteínas se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se usó la técnica de RT-PCR-RT para evaluar el nivel de expresión del gen GPX4 en biopsias de tejido testicular.

Los resultados mostraron una disminución en los porcentajes de los parámetros de viabilidad, motilidad e integridad de la membrana plasmática luego del proceso de congelamiento, la localización intracelular de las proteínas GPx1 (cabeza del espermatozoide) y GPx4 (flagelo del espermatozoide) muestran los principales lugares de acción de estas proteínas, por Western blot obtuvimos bandas de peso molecular variado para GPx1 (formas inactivas de la proteína) y bandas de peso molecular de 27kDa para GPx4 (forma activa); obtuvimos una relación significativa positiva y débil entre el nivel de expresión molecular del gen GPx4 y la motilidad pre y post congelamiento.

La ubicación de las proteínas GPx1 y GPx4 demuestra sus funciones de protección del espermatozoide de alpaca, la cual no se vio afectada por el proceso de criopreservación, pero el estado (forma activa) de la proteína GPx1 si se vio afectada. Existe una relación positiva significativa ($p < 0.01$) entre el nivel de expresión relativa del gen GPx4 respecto a la movilidad espermática.

Palabras clave: Alpaca, criopreservación, espermatozoides, glutatión peroxidasa

SUMMARY

Currently works about cryopreservation of epididymal alpaca sperm have been developed, showing decrease of the parameters of viability, motility and plasma membrane integrity after thawing process, mainly due to reactive oxygen species produced during cooling process.

The aim of this study was to evaluate the effect of cryopreservation over the antioxidant proteins GPx1 and GPx4 from epididymal alpaca sperm. We used samples (n:30) of sperm obtained from the cauda of epididymis, and a slow freezing process with dimethylacetamide (0.375M) as a cryoprotectant agent. It was analyzed the parameters of motility, viability and integrity of plasma membrane before and after cooling process; the protein extracts from sperm was evaluated before and after cooling to examine the state of this protein by western blott technique; the intracellular localization of this proteins was done by immunofluorescence technique, the expression level of gene Gpx4 in testicular tissue biopsies was quantified by RT-PCR-RT.

The results showed a decrease in the percentage of viability, motility and plasma membrane integrity after thawing process; the intracellular localization of GPx1 and GPx4 were identified in regions such as the head (GPx1) and flagellum (GPx4) of sperm, by western blot we got bands of GPx1 inactive forms of the protein and the active form of GPx4 (27 kDa); It was obtained a significant positive relationship between the level of molecular gene expression of GPx4 and motility before and after cooling process

The location of proteins GPx1 and GPx4 demonstrate its functions of protection of alpaca sperm, which was not altered by the cryopreservation process, but the state (active form) of protein GPx1 was affected. There is a positive weak correlation between the level of GPx4 gene relative expression with sperm motility.

Key words: Alpaca, cryopreservation, spermatozoa, glutation peroxidase.

INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación de espermatozoides es una técnica de reproducción asistida muy usada para poder preservar material genético de especies de animales de gran importancia como el de la alpaca, (*Vicugna pacos*). Durante el procedimiento de criopreservación de espermatozoides se produce estrés físico y químico que afecta directamente la membrana plasmática del espermatozoide y consecuentemente regiones importantes como el acrosoma, la pieza media y el núcleo, (Watson et al. 1995; Donnelly et al. 1998; Kao et al. 1998), un factor importante es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Dichas moléculas son producidas por espermatozoides y células germinales, con la mitocondria siendo el principal centro de producción durante la respiración por la producción de adenosin trifosfato (ATP), existiendo relación entre la producción de ERO e infertilidad en humanos infértiles.

Las moléculas de ERO producen alteraciones directamente sobre la membrana plasmática resultando en daño en el DNA, alteraciones en el citoesqueleto, inhibición de la unión espermatozoide ovocito, y efectos en el axonema, observándose disminución en la motilidad (Bailey et al. 1998; Collin et al. 2000). Estas alteraciones conllevan a que el espermatozoide presente un estado de capacitación avanzado, llamado proceso de criocapitación, influenciado por el mismo proceso de criopreservación, fenómeno que también se presenta en espermatozoides criopreservados de alpaca, resultando en una reducción en los niveles de motilidad, viabilidad y capacidad de unirse a zona pelúcida de ovocitos (Cormier et al. 1997; Pommer et al. 2003; Canorio 2009).

Un sistema de protección intracelular a los efectos de las especies reactivas de oxígeno es el sistema antioxidante propio del espermatozoide, el cual evita posibles daños y la peroxidación lipídica. Entre los antioxidantes primarios se encuentra la familia de enzimas Glutathion Peroxidasa (GPx) la cual está compuesta por una serie de isoformas que son capaces de detoxificar, convirtiendo el peróxido de hidrógeno y el peróxido lipídico en moléculas inofensivas como alcoholes estables y agua (Chabory et al. 2010).

En el espermatozoide y tejido testicular se encuentran principalmente la Glutación Peroxidasa 1 (GPX1) altamente conservada, directamente relacionada con la integridad espermática (Dandekar et al. 2002) y la Glutathion Peroxidasa 4 (hidroperoxidasa de fosfolípidos, PHGPX o GPx4) que está altamente presente en todo el tejido testicular y ha sido relacionada directamente con la infertilidad masculina; asimismo trabaja como peroxidasa activa en las células espermátogénicas e igualmente actúa como proteína estructural acumulándose en la cápsula mitocondrial del espermatozoide maduro. Algunas isoformas tanto nucleares, citoplasmáticas y mitocondriales presentes en el espermatozoide han sido relacionadas con casos de infertilidad (Foresta et al. 2002). En el caso de la alpaca, se ha identificado satisfactoriamente la expresión a nivel de tejido testicular del gen GPx4 (Canorio et al. 2010; Tataje et al. 2010).

Estas proteínas cumplen un rol muy importante durante los procesos de estrés oxidativo, siendo determinante su acción para el buen desarrollo y maduración de las células espermáticas de diversas especies de mamíferos, por lo cual, resulta de mucha importancia estudiar estas proteínas antioxidantes durante el proceso de criopreservación y relacionarlas con la calidad espermática presentada luego del proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca.

II.-ANTECEDENTES

1. CAMELIDOS SUDAMERICANOS: LA ALPACA (*Vicugna pacos*)

Los camélidos sudamericanos así como los camélidos del viejo mundo se clasifican taxonómicamente en el orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, y familia Camelidae. A nivel de grupo se dividen en Lamini y Camelini, y a nivel de género en Lama y Vicugna para animales del nuevo mundo y Camelus para los del viejo mundo.

Actualmente existen cuatro especies:

- Llama (*Lama glama*) denominado por Linnaeus, 1758.
- Alpaca (*Lama pacos* o *Vicugna pacos*) denominado así por Linnaeus, 1758 y modificado por Wheeler en 1991.
- Guanaco (*Lama guanicoe*) denominado por Müller (1776).
- Vicuña (*Lama vicugna*) denominado por Molina (1782) o *Vicugna vicugna* denominado por Miller (1924).

Los camélidos sudamericanos juegan un papel muy importante en tierras altas del Perú. Los principales productos que se derivan de los camélidos sudamericanos y del cual radica su importancia son:

1. El vellón, principal producto comercializado en el mercado a nivel nacional e internacional.
2. La carne, cuyo valor nutritivo es similar y en ciertos casos superior a otras carnes.
3. Las pieles y cueros, con múltiples usos industriales y artesanales.
4. El estiércol que se usa como fertilizante o como combustible.
5. Además la llama por su tamaño y fortaleza, se utiliza también como animal de carga y cumple un papel importante en el transporte en las áreas rurales carentes de vías de comunicación.

En el Perú existen 2 especies silvestres de camélidos sudamericanos, la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*), y 2 formas domesticadas, la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*). Los camélidos domésticos alpaca y llama derivarían de los silvestres vicuña y guanaco respectivamente. Las evidencias más directas que se tienen sobre el origen de los domésticos son

restos de huesos, fibras y tejidos, procedentes de diferentes sitios arqueológicos donde ocurrió este proceso (Wheeler et al. 1991).

Vicugna pacos es una especie que representa un factor importante en la economía de nuestro país, siendo el país con la mayor población de alpacas, que llega casi a los 3.5 millones de cabezas y por lo menos 1.5 millones de campesinos de más de 1,000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno, los que se dedican a la crianza de llamas y alpacas según cifras del INEI (2012). En el Perú existen dos razas de alpaca: Suri y Huacaya.

-La raza Huacaya tiene vellón esponjoso y son alrededor del 80.4% de la población total de alpacas (INEI, 2012).

-La raza Suri con vellón largo y lustroso, la población de esta raza es cerca del 15-20%, es mínimo en relación a la raza Huacaya.

Actualmente, predominan las alpacas blancas, sin embargo existe también un porcentaje razonable de alpacas manchadas.

Existe una serie de factores que influyen en la disminución de la calidad de la fibra de la alpaca, que se evidencian por el engrosamiento de la fibra y la pérdida de las tonalidades de color naturales debido al mal manejo y cruce descontrolado entre los diferentes individuos, reducción del número de individuos de la raza Suri, debido a la exportación a otros países de individuos de alta calidad, falta de conocimiento en el manejo para la mejora en alpacas con vellón de calidad.

La crianza de alpacas es una actividad muy importante, sin embargo un mal manejo repercute en la economía, ecología y sociedad de los pueblos andinos, ya que pueden perder uno de sus ingresos económicos más importantes.

1.1.- Fisiología reproductiva del macho de la Alpaca

Los camélidos presentan un pene fibroelástico con una flexura sigmoidea pre-escrotal que permite la retracción del pene en el prepucio en un estado de no erección (Smith, 1999). En las alpacas el pene erecto tiene una longitud de 35 - 40 cm (Brown 2000), la estructura interna consta de tres cuerpos cavernosos que están rodeados por fibras gruesas de la túnica albugínea, con 5-7 mm de espesor en camellos (Elwishy 1988). En su extremo terminal, presenta una proyección cartilaginosa con forma de gancho curvado y tiene un pequeño proceso uretral de

aproximadamente 1 cm de longitud en alpacas (Sumar, 1996). La punta cartilaginosa puede ser una adaptación para facilitar la penetración a través de la cérvix durante la copulación (Smith, 1999).

Los dos testículos se mantienen en un escroto no pendular situado por debajo del ano. El escroto, que es de naturaleza similar a la protuberancia sub-anal encontrado en cerdos, roedores y carnívoros (Brown, 2000), mantiene los testículos (y los espermatozoides contenidos) a una temperatura ligeramente más baja que la temperatura del cuerpo. El peso promedio de los testículos completamente desarrollados es de aproximadamente 15 gramos. Sin embargo, el tamaño y peso testicular de los animales varía considerablemente en relación a su edad y peso corporal. Los ductos eferentes se extienden desde el testículo dentro de la cabeza del epidídimo (Morton, 2008).

El epidídimo es pequeño y estrechamente adherido al testículo (Smith, 1999), el cual consta de una cabeza, cuerpo y cola. La cabeza y el cuerpo son sitios de maduración espermática, mientras que la cola está asociada con el almacenamiento de los espermatozoides (Elwishy, 1988). Los conductos deferentes, son tubos musculares por los que se excretan los espermatozoides al exterior, el cual se origina en la cola del epidídimo. La longitud total del conducto deferente es de unos 40 cm. En la parte final de su trayecto, cerca de la vejiga, el conducto deferente se dilata pero no forma la ampolla característica del conducto deferente como en otras especies (Sumar, 1996).

La próstata es en forma de H y se encuentra en el cuello de la vejiga y las glándulas bulbo uretrales, que son de forma ovalada, se encuentran a ambos lados de la uretra a la salida pélvica. No existen vesículas seminales en los camélidos sudamericanos (Smith, 1999).

1.2.-El espermatozoide

Los espermatozoides, gametos masculinos producidos durante la espermatogénesis, son células elongadas que consisten en una cabeza aplanada que contiene al núcleo y una cola con un sistema que permite la motilidad espermática (Garner y Háñez, 2000). Célula altamente especializada que presenta compartimientos importantes como la región de la cabeza que contiene al núcleo y al acrosoma, la región de la pieza media y flagelo donde se encuentra la

maquinaria metabólica que genera la energía suficiente para el movimiento del espermatozoide.

Durante la maduración final del espermatozoide en el epidídimo los espermatozoides experimentan cambios en su maduración, que se presentan durante 10 a 15 días a través de su paso por el epidídimo donde se llevan a cabo los cambios metabólicos y estructurales, siendo principalmente la cola del epidídimo su lugar de depósito natural en dromedarios (Elwishy, 1988).

Los cambios de madurez en el espermatozoide dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte. Uno de los cambios más notorios del espermatozoide durante la maduración epididimaria es el desarrollo de la motilidad espermática, los lípidos de membrana sufren cambios físicos y químicos lo que influye en el patrón de distribución de proteínas intramembrana (glicoproteínas), siendo un factor importante la presencia de altas cantidades de colesterol en el epidídimo las cuales estabilizan la membrana del espermatozoide.

La maduración espermática es uno de los tres acontecimientos que debe experimentar el espermatozoide antes de que se realice la fecundación, siendo la capacitación y la reacción del acrosoma los otros dos hechos necesarios para la fusión entre espermatozoide y óvulo.

1.2.1.-La Capacitación

Chang y Austin en 1951 observaron por primera vez que el espermatozoide debe permanecer dentro del aparato reproductor femenino antes de estar en condiciones de unirse y penetrar el óvulo, a este proceso se le denominó capacitación. La capacitación ha sido descrita como un complejo de eventos en cascada que ocurren a nivel de la membrana plasmática e intracelularmente, siendo un requisito para que se lleve a cabo la reacción acrosómica y de esta forma se produzca la fecundación (Visconti et al. 1995).

La capacitación involucra eventos de la membrana plasmática que permiten un incremento del influjo de calcio celular, fusión y vesiculación de las membranas plasmática y acrosomal externa y pérdida de las proteínas de la matriz acrosomal, el cual se llama reacción acrosomal, el proceso de capacitación está muy relacionado con cambios en el metabolismo de AMPc y fosforilación de residuos de tirosina en diversas proteínas de membrana (Visconti et al. 1998).

La capacitación se lleva de forma natural dentro del tracto femenino, en un lugar llamado Itsmo, donde ciertas proteínas séricas presentes en el fluido uterino tienden a adherirse a lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide, renovando la barrera de esteroides, generando cambios osmóticos provocando el ingreso de calcio y generando señales intracelulares del tipo de segundo mensajero, activando la maquinaria de la proteína quinasa y del AMPc (Visconti et al. 1998), provocando la fosforilación en residuos de tirosina de ciertas proteínas en la membrana acrosomal.

1.2.2.-La Reacción Acrosomal

La reacción acrosomal es definida como una serie de eventos que involucran la exocitosis de los gránulos secretorios; dicha reacción ocurre de forma espontánea ya sea in vitro o in vivo, son muchas las sustancias candidatas a inducir la reacción acrosomal que se presentan en el sitio de la fecundación. El fluido folicular, el cumulus y la zona pelúcida pueden inducir la reacción acrosomal. La reacción acrosomal es un pre requisito para la penetración de la zona pelúcida por espermatozoides de mamíferos y es un fenómeno que ocurre posterior al proceso de capacitación. Durante la reacción acrosomal la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona y vesícula con la membrana acrosomal externa (Oliphant et al. 1985), como consecuencia de esto, un número de enzimas acrosomales son expuestas, entre ellas el sistema enzimático proacrosina/acrosina es activado, dando lugar a la activación de la enzima: La acrosina (Meizel, 1984).

1.3.-Características del semen, espermatozoide y espermatogénesis en individuos machos de Alpaca

El semen de las alpacas es muy viscoso (Garnica et al. 1993; Bravo et al. 1997) lo cual hace difícil su manipulación para determinar los parámetros espermáticos tales como concentración y motilidad espermática. La licuefacción del semen se da luego de 23 horas (varía entre 8 a 30 horas) de forma natural después de la colección (Bravo, 1997). La concentración de espermatozoides varía desde aproximadamente 30 000 hasta 150 millones por mL en alpacas (Garnica et al. 1993). El pH del semen de camélidos se encuentra en el rango de 7.2 - 8.6 (Bravo et al. 1997).

El movimiento de los espermatozoides en el semen no diluido es descrito como oscilatorio, ya que la mayoría de espermatozoides se mueven hacia atrás y adelante, y sólo del 5 al 10% de los espermatozoides tienen un movimiento progresivo hacia adelante (Bravo et al. 1997). La viabilidad de los espermatozoides presentes en el semen de alpaca varía desde un 58% a 83%, mientras que los porcentajes de espermatozoides con morfología normal están en un rango de 71% a 84% (Bravo et al. 1997). Las anomalías morfológicas en el semen de alpaca incluyen anomalías en los espermatozoides tales como: presencia de doble cola (9-15%), cabezas sin colas y cabezas dobles (3-13%) y la presencia de gotas citoplasmáticas en 1 – 7% de los espermatozoides (Brown, 2000).

El espermatozoide de alpaca presenta una longitud total de 47.29 micras, mientras que el largo y el ancho promedio de la cabeza mide 6.12 y 3.68 micras respectivamente.

La espermatogénesis en los camélidos ha sido dividida en ocho estadios con el desarrollo inicial de la espermatogonia en las regiones externas del túbulo seminífero progresando a espermatocito primario y secundario, espermatidas y espermatozoides. Las células de Leydig se encuentran entre los túbulos seminíferos y secretan la testosterona en las venas testiculares y vasos linfáticos. Estudios histológicos testiculares han mostrado que los túbulos seminíferos en las alpacas tienen un diámetro de 174 – 237µm y que el lumen aparece a los 12 meses de edad y que los primeros espermatozoides y células de Leydig observables se producen poco después, a los 15 a 18 meses de edad (Brown, 2000). Sin embargo, aun no se conoce en detalle el proceso de espermatogénesis de esta especie.

En los últimos años se han venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo de muestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides. Existen diferencias fisiológicas entre los espermatozoides provenientes de semen (eyaculado seminal) con espermatozoides provenientes del epidídimo, principalmente en las propiedades de sus membranas plasmáticas, lo cual afecta en la supervivencia de los

espermatozoides después del congelamiento y descongelamiento (Watson et al, 1995). En un trabajo reciente Morton et al. (2010) reportaron diferencias interesantes entre los medios usados para el proceso de criopreservación, el cual dependió principalmente de la fuente de la muestra (eyaculado o epidídimo). Así mismo, los espermatozoides del epidídimo no han sido expuestos al complejo de secreciones de las glándulas sexuales accesorias; estas secreciones alteran la sensibilidad al frío y la resistencia al congelamiento de los espermatozoides de semen en otros animales (Yu et al. 2002), es decir los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo presentan una mayor resistencia al descenso de temperatura y cambio osmótico.

2.-CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

El proceso de criopreservación es una metodología aplicada en la reproducción asistida.

La criopreservación (congelar a muy bajas temperaturas) de tejidos y células es una técnica que se ha utilizado desde 1700. Este proceso pone a las células en animación suspendida donde pueden retener su viabilidad y procesos metabólicos indefinidamente. En la práctica, las células congeladas son almacenadas a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido.

En 1776, Spallanzani reportó por primera vez el mantenimiento de la motilidad de espermatozoides humanos después de ser expuestos a bajas temperaturas.

A mitades de 1900, la ciencia de la criobiología mejoró rápidamente con el descubrimiento de los efectos de sustancias crioprotectoras las que se agregan a las soluciones celulares. En 1949, Polge descubre la efectividad del glicerol como un agente crioprotector para espermatozoides de pavo y luego en espermatozoides de humano. En 1953, Sherman reporta el congelamiento exitoso de espermatozoides humanos en hielo seco, los cuales fueron descongelados y usados para fecundaciones *in vitro* dando origen así al primer éxito de fecundación *in vitro* con uso de espermatozoides congelados.

Con el pasar de los años, desde 1970 se dio inicio al crecimiento y desarrollo de las técnicas de criopreservación no solo de espermatozoides sino también de ovocitos y embriones. Hoy en día se usan muchos protocolos en los cuales se

trabajan con concentraciones variadas de agentes crioprotectores (ACPs), los cuales son clasificados en dos grandes grupos:

Agentes crioprotectores permeables: Como su mismo nombre lo indica, esta clase de agentes crioprotectores ingresan dentro de la célula ya que poseen un peso molecular relativamente bajo, y desde ahí ejercen un efecto directo sobre las células, la cual es la deshidratación, dentro de este grupo podemos mencionar a los siguientes agentes crioprotectores: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), el propilén glicol, dimetilacetamida (DMA) entre otros.

Agentes crioprotectores no permeables: Los cuales no ingresan dentro de la célula ya que son de peso molecular relativamente alto, y su efecto lo ejercen en el medio exterior, ya que estos agentes crioprotectores mayormente son azúcares y favorecen la deshidratación celular. Dentro de este grupo se encuentran: glucosa, sacarosa, trealosa, fructosa.

Se han establecido las condiciones normales, las cuales han sido encontradas eficaces, para la criopreservación de espermatozoides de diversas especies. El uso de un apropiado protocolo de criopreservación en espermatozoides de mamífero logra mantener con éxito aproximadamente el 50% de supervivencia y un cierto grado de éxito en las fecundaciones *in vitro* la cual es menor si se compara con el éxito de los espermatozoides frescos o no congelados (Donnelly et al. 1998; Green y Watson 2001).

Para facilitar mejoras en la criopreservación de espermatozoides, se necesita comprender las propiedades criobiológicas fundamentales de estas células, incluso sus límites de tolerancia osmótica y la respuesta a la adición, remoción y penetración de agentes crioprotectores (ACPs), también cabe destacar la importancia del rango de congelamiento que se está usando.

Mientras que los ACPs son esenciales para la supervivencia celular durante la criopreservación, su adición y remoción subsiguiente crean un ambiente anisomótico para las células, produciendo cambios de volumen y daño osmótico potencial (Agca et al. 2002; Guthrie 2002).

Además de causar el daño osmótico, los ACPs pueden causar pérdida de la viabilidad celular debido a la toxicidad química.

La pérdida de motilidad del espermatozoide puede ser el resultado de la exposición prolongada a ACPs, y los espermatozoides de diversas especies varían en respuesta al tipo y exposición de los ACPs (Gao et al. 1997).

Se ha visto que, aunque es posible criopreservar espermatozoides y obtener crías a partir de una inseminación artificial, la supervivencia de los espermatozoides después de la criopreservación es muy limitada y requiere perfeccionamientos adicionales en la mayor parte de las especies (Blanco et al. 2000).

2.1.-Efecto de la criopreservación sobre la motilidad espermática

El espermatozoide como célula altamente especializada, presenta una serie de estructuras internas muy relacionadas con la membrana plasmática y la membrana mitocondrial. Estas membranas deben retener un estado intacto y funcional que permita la competencia celular.

La proporción de espermatozoides descongelados funcionales es considerablemente reducida (Holt et al. 1997), la motilidad es uno de los parámetros seriamente afectados (Watson et al. 1995), es también un predictor fuerte de la habilidad de una muestra dada para llevar a cabo la fecundación *in vitro*. Todavía el mecanismo por el cual la motilidad es reducida no está totalmente elucidado en espermatozoides criopreservados de alpaca.

La motilidad espermática es parcialmente dependiente de la función mitocondrial (Kao et al. 1998), las mitocondrias que se encuentran en la pieza media tienen como función proveer de energía a los filamentos del flagelo, permitiendo la propulsión efectiva del espermatozoide en su búsqueda del ovocito y para poder penetrar la zona pelúcida.

Las membranas plasmática y mitocondrial son susceptibles a daño por el proceso de criopreservación, y este daño puede diferir dependiendo de la medida en la cual el espermatozoide tenga accesibilidad a los agentes crioprotectores.

El patrón de movimiento del espermatozoide refleja el ambiente bioquímico y condiciones físicas sometidos a los espermatozoides: Aunque los estados tempranos de la criopreservación (dilución, enfriamiento y periodo de estabilización) no afectan totalmente la motilidad, esos estadios cambian los parámetros finos o sofisticados de la motilidad espermática.

La velocidad de la motilidad progresiva en espermatozoides de especies de mamíferos como el búfalo también se encontró disminuida luego del proceso de estabilización a 4°C y esta disminución de la velocidad se acrecentó después del proceso de criopreservación y descongelación (Rasul et al. 2001), esto posiblemente debido al incremento de la permeabilidad celular y al incremento

de la viscosidad del medio extracelular a 4°C (Amann et al. 1980), que se sustenta en la disminución de la velocidad de la motilidad está relacionada con el descenso de la temperatura del medio de criopreservación (Holt et al. 1997).

El descenso de la velocidad post descongelamiento puede ser debido a daños a nivel de la mitocondria (Jones y Stewart 1979) y al axonema (Courten et al. 1989) del espermatozoide.

2.2.-Efecto de la criopreservación sobre la membrana plasmática

La integridad funcional de la membrana plasmática es de importancia primordial para la habilidad o capacidad del espermatozoide de resistir el congelamiento así como de realizar la fecundación, lo cual en diversas especies como búfalo (Rasul et al. 2001) se ha encontrado disminuida luego del proceso de criopreservación, esto debido a que durante el proceso en sí de criopreservación, la membrana plasmática del espermatozoide es desestabilizada debido a las bajas temperaturas así como a la alta concentración de sales (Holt y North 1994). La pérdida de la membrana plasmática sobre la región entera del acrosoma, una proyección marcada en la parte anterior de la membrana acrosomal externa, vesiculación extensiva, disrupción de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal externa son los defectos de membrana que mayormente se encuentran en los espermatozoides descongelados de bovino.

Los componentes lipídicos de la membrana plasmática de espermatozoides de carnero (Holt y North 1994) y de toro (Shannon y Vishwanath 1995) son significativamente reducidos debido al proceso de criopreservación, encontrándose valores de integridad de membrana muchos menores en comparación a espermatozoides frescos.

2.3.-Efecto de la Criopreservación sobre el acrosoma

La presencia del acrosoma es importante en el proceso de la fecundación y ha sido altamente relacionado con la fertilidad de espermatozoides criopreservados de bovino (Saacke y White 1972), en búfalo se encontró un porcentaje menor de espermatozoides con acrosoma intacto luego del proceso de criopreservación (Rasul et al. 2001).

Así como la membrana plasmática y la motilidad son influenciadas por el proceso de criopreservación, el acrosoma es adversamente afectado por el proceso de

descongelamiento (Courtens et al. 1989), esto se ha visto tanto en espermatozoides criopreservados de búfalo (Rasul et al. 2001), toro y conejo (Holt y North 1994). Al producirse daño y desestabilización a nivel del acrosoma ocurre consecuentemente la liberación del contenido enzimático acrosomal, enzimas como la hialuronidasa y la acrosina (Palencia et al. 1996).

3.-CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA

En alpaca (*Vicugna pacos*) el uso de técnicas como la criopreservación de gametos representa un método de manejo sostenible y facilita el estudio a nivel genético y molecular de esta especie, así como su conservación.

Actualmente los resultado en la criopreservación del semen de alpaca es pobre debido a que no está muy bien desarrollada (Bravo et al. 2000); por otro lado el manejo del semen es limitado por sus características, altamente viscosa, haciendo difícil su manejo, dilución y estudio fisiológico de los espermatozoides.

Trabajos sobre criopreservación de semen de alpaca obtenidos con vagina artificial presentan resultados de solo el 6-20% de motilidad post descongelamiento (Vaughan et al. 2003; Santiani et al. 2005), raramente superan el 40%, aunque Bravo et al. (1996) reportaron una motilidad post descongelamiento de 45 %, pero en la publicación no brindan mayores detalles que permitan la réplica de su metodología.

En los años recientes se ha generado el interés en criopreservar espermatozoides epididimarios de alpaca, cuyo manejo en el laboratorio es mucho más satisfactorio y a permitido obtener muestras con buena concentración de espermatozoides maduros. En un trabajo reciente (Morton et al, 2010) reportaron diferencias interesantes entre los medios usados para el proceso de criopreservación, el cual dependió principalmente de la fuente de la muestra, eyaculado o epidídimo, observándose diferencias fisiológicas, principalmente en las propiedades de la membrana plasmática, lo cual afecta la supervivencia de los espermatozoides después del congelamiento y descongelamiento (Watson et al, 1995).

El uso de agentes crioprotectores permeables es esencial para la viabilidad de los espermatozoides post descongelamiento ya que ellos minimizan la formación de hielo intracelular, pero la introducción y remoción de estos agentes crioprotectores

producen daño a la célula. La mayoría de trabajos sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca han empleado glicerol (6-7%) como agente crioprotector, sin embargo, los resultados post descongelamiento demuestran una recuperación pobre tras la descongelación, acompañada con la pérdida parcial de la motilidad inicial (Vaughan et al. 2003, Valdivia et al. 2005, Santiani et al. 2005). Recientemente una metodología eficiente de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca ha sido desarrollada, la cual utiliza glicerol a una concentración de 3% (Morton et al. 2007). A pesar de sus beneficios, glicerol es potencialmente citotóxico a algunas concentraciones (Almilid et al. 1988, Holt et al. 2000, Watson et al. 2000), y tiene un efecto contraceptivo en algunas especies (Hay et al. 1997; Sexton et al. 1975).

Son pocos los estudios que se han enfocado en crioprotectores alternativos para la criopreservación de espermatozoides de alpaca, estimulando la búsqueda de nuevos agentes como dimetilacetamida (DMA), el cual ha sido usado en otras especies (Ball et al. 2001, Lovelock y Bishop 1959), ello debido a su naturaleza altamente hidrofílica y su bajo tamaño molecular, así mismo DMA ha sido usada en la criopreservación de espermatozoides de aves, (Blanco et al. 2000), mamíferos como el koala y el canguro (McClean et al. 2008), y es el agente crioprotector más usado en la criopreservación de espermatozoides de peces. Actualmente se han venido desarrollando trabajos de criopreservación de espermatozoides de epidídimo de alpaca, evaluando principalmente el efecto de agentes crioprotectores permeables como dimetilacetamida a diferentes concentraciones y usando un sistema de congelamiento lento termocontrolado, observándose que el porcentaje de sobrevivencia de estos espermatozoides es mayor (27%) cuando se usa el agente crioprotector dimetilacetamida a una concentración entre 0.2M y 0.8M (Canorio et al. 2009).

4.-LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y SU ACCIÓN FRENTE AL PROCESO DE CRIOCAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS

Durante el procedimiento de criopreservación de espermatozoides se produce estrés físico y químico que afecta directamente la membrana plasmática del espermatozoide y consecuentemente regiones importantes como el acrosoma, la pieza media y el núcleo, (Watson et al. 1995; Donelly et al. 1998; Kao et al. 1998).

Un efecto importante es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) moléculas que son producidas por espermatozoides y células germinales, siendo la mitocondria el principal centro de producción de adenosin trifosfato (ATP) durante la respiración en células espermáticas, existiendo relación entre la producción de ERO e infertilidad en humanos. Las ERO son radicales libres que causan daño oxidativo, son moléculas altamente reactivas, que presentan un tiempo de vida corto, en su estructura presentan electrones desapareados girando en sus orbitas externas, por lo cual oxidan a cualquier molécula vecina para salir de su equilibrio, alterando su estructura y convirtiéndola en otro radical libre. Estas especies químicas se producen como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno durante procesos fisiológicos o en respuesta a factores exógenos. Durante la respiración celular los electrones se transfieren del NADH al oxígeno a través de una cadena de tres grandes complejos proteicos llamados NADH-Q reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa. Existen dos fuentes de generación de O_2^- en la cadena transportadora de electrones: a través de la reducción de la ubiquinona se forma un radical libre (RL) parcialmente reducido a ubisemiquinona (QH), la cual interactúa con el O_2 para producir O_2^- . Este mecanismo es el principal responsable de la producción de ERO en la mitocondria. El otro mecanismo de producción de O_2^- en la mitocondria es el que involucra la flavoproteína NADH deshidrogenada. El grupo flavina de esta enzima es reducido durante el transporte electrónico al radical flavina semiquinona que al reaccionar con el O_2 produce O_2^- en una reacción similar a la de la ubiquinona. En la literatura se reportan otras vías por las cuales ocurre la formación de ERO, como es la reacción de éstas con los metales de transición (Hernández-Matos et al. 2010).

Las moléculas de ERO producen alteraciones directamente sobre la membrana plasmática resultando en daño en el DNA, alteraciones en el citoesqueleto, inhibición de la unión espermatozoide ovocito, y efectos en el axonema observándose disminución en la motilidad (Bailey et al. 1998; Collin et al. 2000). Estas alteraciones conllevan a que el espermatozoide presente un estado de capacitación avanzado, llamado proceso de criocapacitación, influenciado por el mismo proceso de criopreservación, fenómeno que también se presenta en espermatozoides criopreservados de alpaca (Canorio 2009), resultando en una

reducción en los niveles de motilidad, viabilidad y capacidad de unirse a zona pelúcida de ovocitos (Cormier et al. 1997; Pommer et al. 2003).

Un sistema de protección intracelular a los efectos de las ERO es el grupo de proteínas antioxidantes propio del espermatozoide, las cuales evitan los posibles daños provocados por las ERO, actuando sobre la peroxidación lipídica. Entre los antioxidantes presentes en el espermatozoide se encuentra la familia de enzimas Glutathion Peroxidasa (GPx) la cual está compuesta por una serie de isoformas que son capaces de detoxificar, convirtiendo el peróxido de hidrógeno y el peróxido lipídico en moléculas inofensivas como alcoholes estables y agua (Chabory et al. 2010). En el espermatozoide y tejido testicular se encuentran principalmente la Glutathion Peroxidasa 1 (GPX1) y la Glutathion Peroxidasa 4 (hidroperoxidasa de fosfolípidos, PHGPX o GPx4).

La Glutathion Peroxidasa 1 (GPX1) es una proteína tetramérica de peso molecular aproximado de 88 kDa, cada subunidad o monómero tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa (Saaranen et al. 1989, Jelezarski et al. 2008), es una proteína muy conservada entre las diversas especies (Dandekar et al. 2002). Actúa sobre el peróxido de hidrogeno e hidroperóxido soluble orgánico y usa a la glutathion reducida como equivalente reductor. Está directamente relacionada con la integridad espermática, específicamente con la motilidad espermática (Dandekar et al. 2002), sin embargo ratones knockout deficientes de GPx1 son fértiles (de Haan et al. 1998).

La Glutathion Peroxidasa 4 (hidroperoxidasa de fosfolípidos, PHGPX o GPx4) una de las más importantes integrantes de la familia de la glutathion peroxidasa, es una selenoproteína que es altamente expresada a nivel de tejido testicular (Foresta et al. 2002) relacionándose la expresión de esta enzima con los parámetros de fertilidad en hombres fértiles e infértiles. Su importancia radica en que su deficiencia está relacionada con la supresión de la espermatogénesis (Foresta et al. 2002), asimismo, tiene también una función estructural de protección de la pieza media del espermatozoide, protegiendo directamente al sistema de mitocondrias que es muy importante para el desarrollo de la motilidad espermática (Mariorino, 2003). Trazas de expresión y acción de la proteína PHGPx en espermatozoides maduros ha sido correlacionados con parámetros de fertilidad en hombres fértiles (Hirotaka et al. 2001). Esta proteína actúa como un monómero

cuyo peso molecular oscila entre los 22-27kDa y se expresa en las células espermatogénicas e igualmente actúa como proteína estructural en espermatozoides maduros, en ellos se acumula en la cápsula mitocondrial de la pieza media (Foresta et al. 2002).

Estas proteínas cumplen un rol muy importante durante los procesos de estrés oxidativo, siendo determinante su acción para el buen desarrollo y maduración de las células espermáticas de diversas especies de mamíferos.

III.- HIPÓTESIS

H1: El proceso de criopreservación afecta la función de las proteínas antioxidantes GPx1 y GPx4 de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpacas.

H0: El proceso de criopreservación no afecta la función de las proteínas antioxidantes GPx1 y GPx4 de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpacas.

IV.- OBJETIVOS

4.1.-Objetivo general

Evaluar el efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPx1 y GPx4 de espermatozoides epididimarios de alpaca.

4.2.-Objetivos específicos:

1. Determinar la calidad de los espermatozoides pre y post congelamiento mediante ensayos de viabilidad, motilidad e integridad de membrana plasmática
2. Analizar la localización intracelular de las proteínas GPx1 y GPx4
3. Analizar el estado de las proteínas GPx1 y GPx4.
4. Cuantificar los niveles de expresión a nivel transcripcional del gen GPx4 en biopsias de tejido testicular.

V.-MATERIALES

5.1.-Material biológico

Las muestras de tejido testicular y espermatozoides epididimarios fueron obtenidos de alpacas machos cuya edad se encontraba entre los 4 años. Estas muestras fueron obtenidas en el camal municipal de la ciudad de Huancavelica. Se usó un tamaño muestral de 30 individuos. La edad fue determinada mediante el examen dentario de los animales realizado por el médico veterinario del camal.

Los testículos fueron diseccionados y pesados; uno de los testículos con el epidídimo intacto fueron transportados en suero fisiológico a 4°C hasta el laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal en la ciudad de Lima para las pruebas fisiológicas.

Al testículo y epidídimo restante se les extrajo una pequeña biopsia de la zona medular de 1 cm³ para las pruebas de expresión genética.

En el laboratorio, 11 horas post mortem, se procedió a aislar los epidídimos, de los cuales sólo se utilizó la región de la cola, la cual fue removida y cortada en pequeñas piezas, los espermatozoides fueron obtenidos en suero fisiológico a 37°C. Luego la suspensión conteniendo a los espermatozoides fue pasada a tubos de plástico de 10 ml, colocados luego en una incubadora a 37°C por quince minutos para permitir que los espermatozoides se recuperen. Pasado este tiempo se procedió a evaluar la motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática (Figura No 1 y 2).

5.2.-Material Químico

1.-Medios de cultivo, de lavado, de capacitación, de criopreservación:

- Medio Buffer Fosfato salino Dulbecco's (DPBS, SIGMA Cód. D5773): El cual se encontraba suplementado con cloruro de calcio, 0.075g de penicilina, 0.075g de estreptomicina.
- Medio HAM F10 (SIGMA Cód. N6635): El cual se encontraba suplementado con 0.075g de penicilina, 0.075g de estreptomicina, 0.245g de lactato de calcio, y 2.1 g de bicarbonato. para usar el medio Ham F10

en los procesos de capacitación se le adicionó BSA a la concentración de 4mg/ml.

- Medio Tes.Tris Yolk, contenía una solución de citrato de sodio 5% (SIGMA Cód. D1546), Tes 2% ((SIGMA Cód. T1375), Trizma Base 8% (SIGMA Cód. T6066), Yema de huevo 20%, suplementados con una solución 1:1000 de estreptomicina y heparina.

2.-Soluciones:

- Solución de eosina Y 0.5%: Contenía 50mg de eosina en 10ml de Cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.
- Solución hiposmótica: Contenía 0.1470 g de citrato de sodio y 0.2702 g de fructosa, disueltos en 20ml de agua
- Buffer fosfato salino (PBS): NaCl 124 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, y KH₂PO₄ 3 mmol/L.

3.-Reactivos:

- Para la extracción de proteínas:

Ortovanadato de sodio (0.2M), Buffer muestra 5X (Tris HCl 1M pH: 6.8, Glicerol 50%, Sodio Dodecil Sulfato 10%, β-Mercaptoetanol 14.4mM, Azul de bromofenol 1% y Agua destilada 7.4ml).

- Para Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)
 - a. Gel concentrador al 5%: Solución de Acril-bis acrilamida (250 µl), buffer Tris 0.5M pH: 6.8 (190 µl), agua destilada (1.05 ml), sodio dodecil sulfato al 10% (15 µl), persulfato de amonio al 10% (15 µl), TEMED (5 µl).
 - b. Gel resolutivo al 10%: Solución de acrilamida-bisacrilamida (990 µl), Buffer Tris 1.5M pH 8.8 (750 µl), agua destilada (1.2 ml), sodio dodecil sulfato al 10% (30 µl), persulfato de amonio al 10% (30 µl), TEMED (10 µl).

- c. Para la coloración en plata: ácido acético al 7%, metanol al 50%, nitrato de plata al 20%, hidróxido de sodio al 30%, hidróxido de amonio 14.8 M, ácido cítrico al 1%, formaldehído al 37%.
- Para la técnica de Western Blot:
 - a. Buffer de bloqueo: Se usó una solución de 50ml de PBS la cual contenía 2g de albúmina sérica bovina (BSA), 50 µl de gelatina IGSS y 0.007g de azida de sodio.
 - b. Buffer de lavado: Se usó una solución de 50ml de PBS la cual contenía 0.4g de albúmina sérica bovina (BSA), 50 µl de gelatina IGSS y 0.007g de azida de sodio.
 - c. Solución de revelado con plata: Se usó el kit de amplificación con plata Inten SEM (Amershan), el cual consistía en una Solución A o iniciador de reacción y una Solución B o amplificador de reacción.
- Para la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real:
 - a. Dietilpirocarbonato (DEPC), TRIreagent® (Sigma Aldrich), hipoclorito de sodio al 2.5 %, Deoxyribonuclease I (DNaseI), RNase-free (Fermentas), Kit “Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas), MgCl₂, dNTPs, Trehalosa (#T3663), Taq Recombinante (Fermentas DreamTaq®), Kit de *Taq DNA Polymerase recombinant* (Fermentas), amortiguador (buffer) de (NH₄)₂SO₄, kit Master DNA SYBR Green I (Roche), agua de grado molecular.

4.-Anticuerpos

- Anticuerpo primario anti fosfoglutation GPx1, ABCAM, USA.
- Anticuerpo primario anti fosfoglutation GPx4, ABCAM, USA
- Anticuerpo secundario Anti Región Fab de Ig G de conejo marcado con oro coloidal, ABCAM, USA.
- Anticuerpo secundario Anti Región Fab de Ig G de conejo marcado con FIT-C, ABCAM, USA.

5.3.-Material de Vidrio y Plástico

Tubos eppendorff de 1.5ml, tubos de plástico de 10ml, puntas de micropipeta de 100 μ l, puntas de micropipeta de 1000 μ l, puntas de micropipeta de 10 μ l, placas petri de plástico, placas de cultivo, laminas portaobjeto de vidrio, laminas cubreobjeto de vidrio, cámara de Neubauer, envases de enfriamiento, recipientes de plástico, pajuelas de congelamiento de 250 μ l.

5.4.-Equipos

Micropipeta de 100 μ l, micropipeta de 1000 μ l, microscopio compuesto de campo claro con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X, microscopio invertido con objetivos de 4X, 10X y 40X, incubadora de CO₂, incubadora simple, baño María, refrigeradora, congelador vertical, equipo de electroforesis Mini protean BIORAD, equipo de transferencia Mini Trans Blot BIORAD, equipo de congelamiento termocontrolado CRYOBATH, computador pentium III, software de control del equipo de congelamiento termocontrolado Cryogenesis Ver 4.0, cámara digital OLYMPUS SP310, centrifuga normal, ultracentrífuga, tanque de nitrógeno, termociclador convencional de gradiente MultiGene Mini de Labnet's, termociclador en Tiempo Real LightCycler 2.0 de Roche Applied Science.

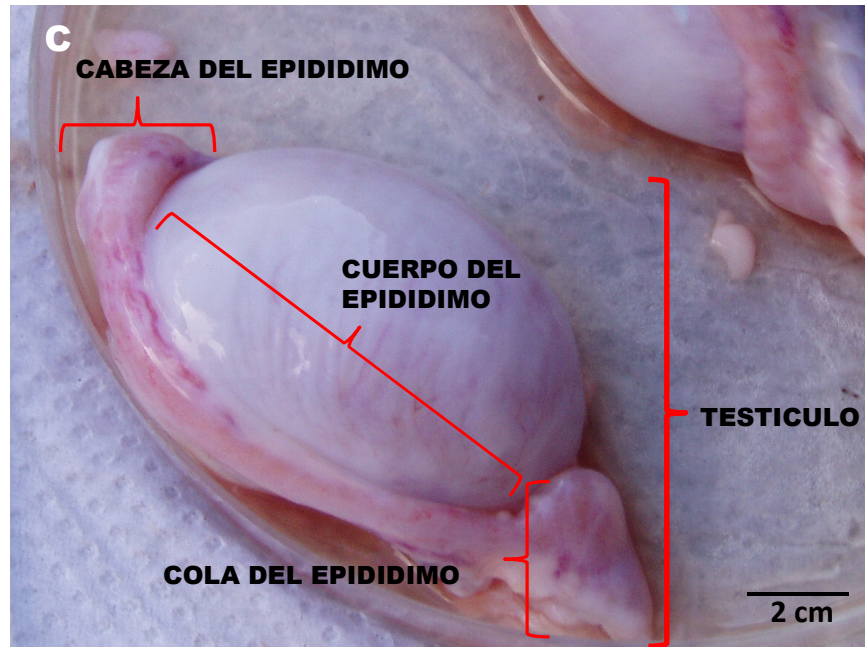


Figura No 1: Colección de la muestra .Muestras de epidídimo obtenidas del camal municipal de Huancavelica. A) Ejemplares de animales usados en el estudio, B) Camal Municipal de la ciudad de Huancavelica, C) Morfología del testículo y epidídimo de alpaca.

VI.-METODOS

6.1.-Diseño experimental

El diseño fue completamente aleatorizado, el tamaño muestral fue de 30 individuos (n: 30) se usaron muestras de individuos de 4 años de edad, longitud de testículo de 4.61 ± 0.69 cm, cuyo peso de 14.01 ± 0.50 g.

La fase experimental consistió en criopreservar espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, luego se realizó los siguientes análisis:

En el primero de ellos se procedió a realizar un análisis de la calidad de los espermatozoides, permitiendo conocer algunas características microscópicas de los espermatozoides pre y post congelamiento, mediante la evaluación de la motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática.

El segundo análisis consistió en la identificación (localización intracelular) de las proteínas GPx1 y GPx4 vía inmunohistoquímica, esto se realizó pre y post congelamiento.

El tercer análisis consistió en evaluar el estado de las proteínas GPx1 y GPx4 mediante la técnica de western blott

El último análisis consistió en evaluar el nivel de expresión del gen GPx4 en muestras de tejido testicular y su posible relación con el nivel de motilidad pre y pos congelamiento de los espermatozoides.

6.2.-Análisis de la calidad de los espermatozoides pre y post congelamiento mediante el uso de pruebas de rutina

Se realizó las siguientes pruebas a las muestras de espermatozoides pre y post congelamiento:

6.2.1.-Medición de la concentración

La concentración fue evaluada de acuerdo al Criterio del Organismo Mundial de la Salud. Se usó el método de recuento con cámara o hemocitómetro de Neubauer.

6.2.2.-Evaluación de la motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática

La motilidad fue evaluada de acuerdo al Criterio del Organismo Mundial de la Salud, (WHO 2010), la cual distingue a los espermatozoides con motilidad progresiva o no progresiva de los que son inmóviles de la siguiente manera:

- Motilidad progresiva (MP): espermatozoides moviéndose activamente, sea de manera lineal o en círculos grandes, independientemente de la velocidad.
- Motilidad no progresiva (NP): todos los otros patrones de motilidad con ausencia de progresión, por ejemplo: nadando en pequeños círculos, la fuerza flagelar con apenas desplazamiento de la cabeza o cuando solo un latido flagelar puede ser observado.
- Inmotilidad (IM): sin movimiento.

Los resultados fueron expresados en porcentajes, considerando la motilidad total (MOT) de la muestra. La MOT abarca MP y NP. Todo este análisis fue subjetivo realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X).

La viabilidad fue evaluada mediante el uso del colorante vital eosina Y, para ello se usó muestras de espermatozoides incubadas con una gota del colorante eosina Y a 37°C por quince minutos, luego se procedió al conteo de los patrones presentados (Figura No 2). Los patrones observados fueron:

- Espermatozoides incoloros: espermatozoides vivos
- Espermatozoides de color rosa: espermatozoides muertos.

Los resultados fueron expresados en porcentajes, todo el análisis fue subjetivo realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X).

La integridad de membrana fue evaluada a través del test de endosmosis, el cual consistió en incubar 100 μ l de la muestra en 900 μ l de una solución de fructosa-citrato a 600 miliosmoles (mOsm) por treinta minutos a 37°C. Luego se procedió a contar los patrones de formas que presentaban los espermatozoides.

Luego de la incubación, se analizó una alícuota de 10 μ L en microscopio compuesto de campo claro (400x), contando un total de 100 espermatozoides.

Fueron considerados positivos al test de endósmosis los espermatozoides que presentaron las colas hinchadas o enrolladas (Jeyendran et al. 1984) lo cual indicó que la membrana plasmática se encontraba funcionalmente activa. Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopia óptica de campo claro (400X).

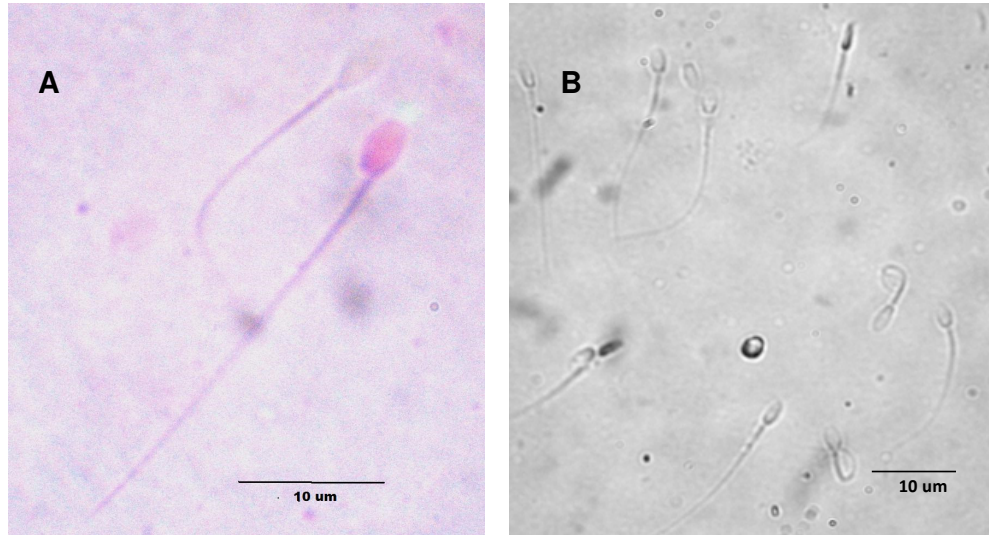


Figura No 2: Parámetros de análisis: Viabilidad e integridad de membrana. (A) Espermatozoides coloreados de rosa representan a espermatozoides muertos y los espermatozoides incoloros representan a espermatozoides vivos, (B) Patrones de Flagelo enrollado que representan a espermatozoides con la membrana plasmática intacta, y espermatozoides con el flagelo recto que representan a espermatozoides con membrana plasmática alterada. Las observaciones en A son a 400X, las observaciones en B son a 200X.

6.3.-Proceso de criopreservación de los espermatozoides.

El medio usado para el proceso de criopreservación fue el medio Tes tris Yolk, el cual incluía una solución de citrato de sodio al 5% (SIGMA, código D1546), solución de Tes al 2% (SIGMA código T1375), Trizma Base al 8% (SIGMA código T6066), y yema de huevo al 20%; la solución final fue suplementada con estreptomycin y penicilina (1:1000). Luego el medio ya preparado fue suplementado con el agente crioprotector Dimetilacetamida a la concentración de 0.375M

Las muestras iniciales de espermatozoides fueron ajustadas a 20×10^6 espermatozoides/mL, las cuales fueron mezcladas en una proporción 1:1 con el medio Tes-Tris-Yolk suplementado con el agente crioprotector haciendo una concentración espermática final para la criopreservación de 10×10^6 espermatozoides/mL, la que fue mantenida a 4°C por una hora, lo cual correspondió al tiempo de estabilización, periodo donde hay un descenso en la temperatura de 37°C a 4°C a una velocidad de 0.5 °C/min. Luego, las muestras fueron colocadas en pajuelas de criopreservación de 0.25ml, selladas y colocadas en el sistema de congelamiento (CL3300, Cryologic, Australia) termocontrolado por el software Cryogenesis 4.1 (Cryologic, Australia), a velocidades de 3-8°C/min (Figura No 3).

El protocolo de congelamiento fue el siguiente: La temperatura inicial de 4°C fue mantenida por 5 min. Luego se hizo un descenso de +4°C a -2°C a 3°C/min y mantenidos a -2°C por min. Allí se procedió a hacer la siembra (Seeding), que consiste en tocar la base de las pajuelas con la punta de una pinza a -196°C hasta que se viera un ligero cambio de color en las paredes de las pajuelas, lo cual indica la formación de microcristales. Se continuó con el descenso de la temperatura hasta -30°C (velocidad de congelamiento de 5°C por min) y de -30°C a -80°C (velocidad de congelamiento de 8°C/min). Finalmente, las pajuelas se colocaron en nitrógeno líquido (-196°C).

Las muestras fueron descongeladas en baño María a 50°C por siete segundos luego de 72 horas de haber sido almacenados en el tanque de nitrógeno líquido, la muestra descongelada fue centrifugada a 600g por 10 minutos y el pellet obtenido fue resuspendido en 0.5mL de medio HAM F1 y mantenido a 37°C por 10 minutos, luego se procedió a evaluar la motilidad, viabilidad e integridad de membrana en los espermatozoides.

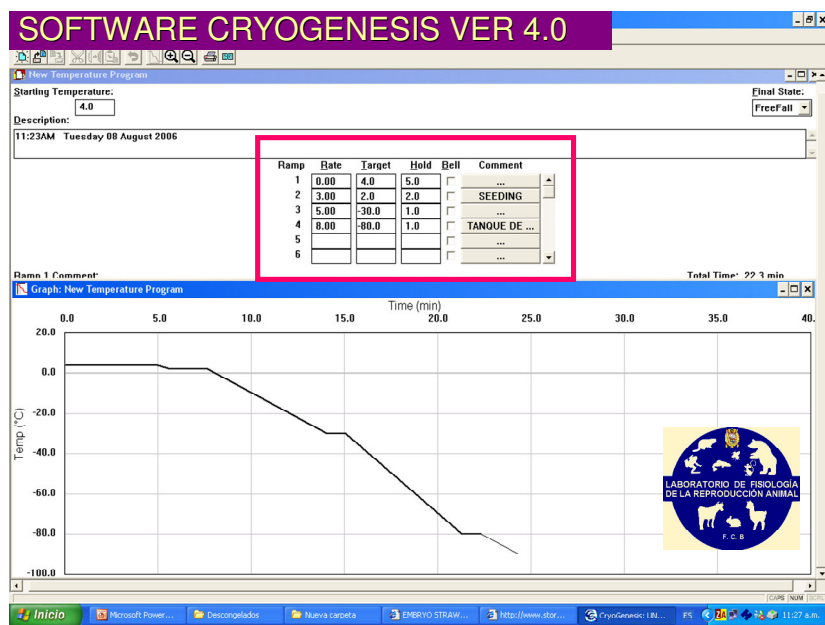
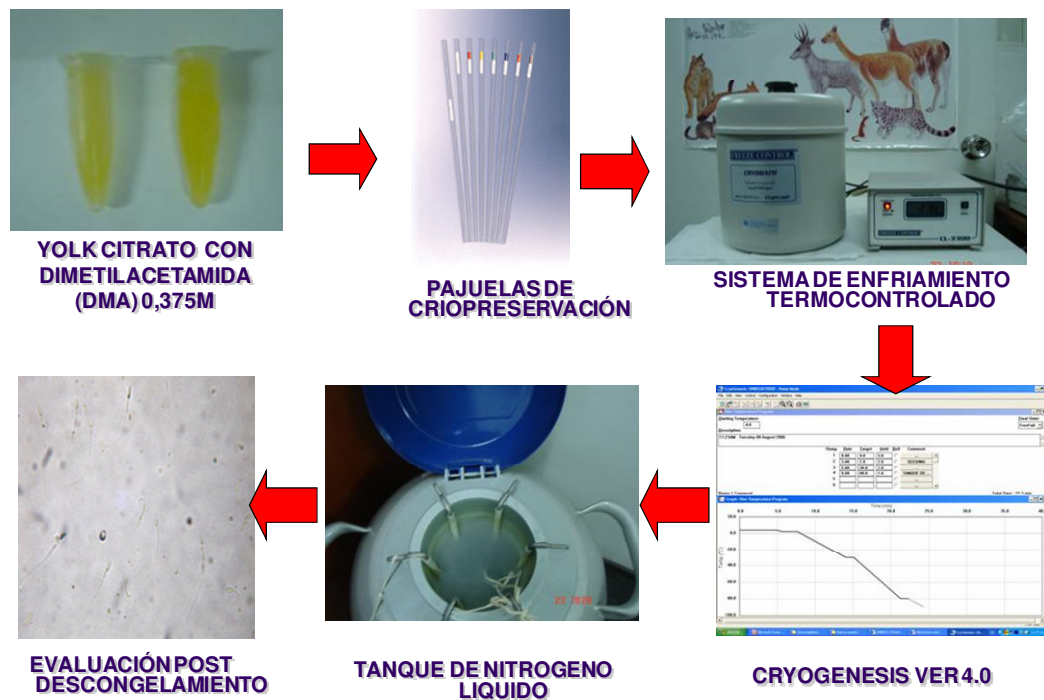


Figura No 3: Proceso de criopreservación. Material usado y el software Cryogenesis Ver 4.0 (congelamiento lento mediante el uso de sistema de enfriamiento termocontrolado)

6.4.-Inmunolocalización intracelular de las proteínas GPx1 y GPx4

Para este estudio se usaron los siguientes anticuerpos: Anticuerpo Monoclonal primario hecho en conejo anti Glutation peroxidada 1 (ab108427, ABCAM), Anticuerpo Monoclonal primario hecho en conejo anti Glutation peroxidada 4 (ab125066, ABCAM), y para la visualización de las mismas se usó un Anticuerpo secundario hecho en cabra Anti IgG de conejo unido a una molécula de FITC (ab97050, ABCAM). Las muestras tanto frescas y descongeladas fueron separadas en dos grupos: Análisis de Gpx1 y Análisis de Gpx4, para lo cual las muestras de espermatozoides fueron fijadas en láminas portaobjetos mediante el uso de una solución de paraformaldehído al 4%, por un periodo de un minuto, luego se lavó las láminas dos veces con PBS, cada lavado duró entre 10 a 15 minutos. Se permeabilizó las muestras con una solución de Triton-100 al 0.25% por un periodo de tres minutos, luego se lavó las láminas con una solución PBS. Se dejó incubando las láminas con PBS que contenía BSA al 1% (solución de bloqueo) la cual satura los posibles sitios de unión inespecífica con el anticuerpo primario, esto por un periodo de una hora, luego se procedió a lavar las laminas con PBS, luego dependiendo del grupo se incubó las láminas con una solución de PBS con BSA al 1% suplementado con el anticuerpo anti fosfoglutation peroxidasa 1 (1:1000) o suplementado con el anticuerpo anti fosfoglutation peroxidasa 4 (1:1000), se dejó incubando por 90 minutos. Luego se lavó las láminas con PBS, tres veces, cada lavado fue de 10 minutos y se procedió a incubar por 60 minutos las láminas con el anticuerpo secundario específico para región Fab del IgG de conejo conjugado a FITC.

Luego se lavo las láminas con PBS, tres veces, cada lavado fue de 10 minutos y se procedió a observar las muestras mediante el uso de un microscopio de fluorescencia, se usó un filtro azul y las observaciones fueron realizadas a 400X. Tanto para los espermatozoides frescos y descongelados se procedió a evaluar el marcaje (emisión de fluorescencia) en las partes del espermatozoide donde se encuentran presentes las proteínas GPx1 y GPx4.

6.5- Detección de las proteínas GPx1 y GPx4 mediante Electroforesis SDS Page y Western Blot

Se siguió la metodología descrita por Visconti (Visconti et al. 1995), para ello se usaron suspensiones de espermatozoides frescos y descongelados a una concentración de 5×10^6 espermatozoides, los cuales fueron centrifugados a 16000 g a temperatura ambiente en buffer fosfato salino (PBS, pH =7,4) que contenía ortovanadato de sodio a una concentración de 0.2 mM. Las proteínas espermáticas fueron extraídas en un buffer de solubilización en condiciones no reductoras y fueron calentadas a 100°C por 5 minutos, luego la suspensión obtenida fue centrifugada por 3 minutos a 16000 x g, al sobrenadante se le agrego β -mercaptoetanol, luego fueron calentadas nuevamente a 100°C por 5 minutos y centrifugados a 16000 x g por un minuto.

Las proteínas solubilizadas fueron usadas para su separación en minigeles SDS-PAGE al 10% (Williams et al. 1997), se usó 8ug de proteína por carril. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de nitrocelulosa a 350A por una hora, se usaron los siguientes anticuerpos: Anticuerpo Monoclonal primario hecho en conejo anti Glutation peroxidasa 1 (ab108427, ABCAM), Anticuerpo Monoclonal primario hecho en conejo anti Glutation peroxidasa 4 (ab125066, ABCAM). Se incubó según sea el grupo con el anticuerpo primario antifosfoglutation peroxidasa 1 (53 μ l/5ml de buffer) o con el anticuerpo anti fosfoglutation peroxidasa 4 (55 μ l/5ml de buffer) por una hora. Se lavó tres veces con el buffer de lavado por cinco minutos cada lavado. Se Incubó con el segundo anticuerpo anti Fab de IgG de conejo conjugado a una molécula de oro coloidal (ABCAM, 17 μ l/5ml) por tres horas y se lavó por tres veces con buffer de lavado por cinco minutos cada vez, luego se procedió al mismo procedimiento de lavado pero haciendo uso de PBS y finalmente con agua destilada.

La visualización y detección de la bandas se hizo con el Kit de tinción con plata IntenSEM Intense tmM Silver Enhancement (Amersham). Cuando se visualizaron las bandas la reacción se detuvo con agua destilada.

6.6.-Análisis de la expresión molecular del gen GPx4

6.6.1.-Colecta de muestra biológica

Las colectas de biopsias de testículo fueron realizadas con instrumental libre de enzimas degradadoras de ácido ribonucleico, lavado continuamente con agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC); transportadas y conservadas en Nitrógeno líquido a -196°C para los estudios moleculares en Lima. Todas las muestras fueron debidamente codificadas para la posterior asociación con los resultados fisiológicos.

6.6.2.-Extracción del ácido ribonucleico (RNA):

Las biopsias medulares de testículo preservadas en nitrógeno líquido, fueron descongeladas lentamente a temperatura ambiente, se les agregó 1ml del reactivo TRIreagent (Sigma Aldrich), para luego homogenizarlas con ayuda de un pequeño motor de uso odontológico (Powertec mini-grinder PT1403) a 15,000 rpm, usando cabezales abrasivos. Para evitar la contaminación cruzada después de cada muestra, el cabezal fue enjuagado profusamente con hipoclorito de sodio al 2.5 % y después con agua tratada con DEPC. El RNA total fue aislado siguiendo el protocolo recomendado por TRI reagent, indicado por el fabricante, con un volumen final de 50 μl para cada muestra extraída. La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro (UNICO modelo: UV2100 Spectrophotometer), tomando la medida de absorbancia de A_{260}/A_{280} correspondiente a 40 μg de RNA.

Para minimizar los posibles falsos positivos el RNA obtenido fue sometido a un tratamiento con DNases usando Deoxyribonucleasa I (DNaseI), RNase-free (Fermentas). Se partió de 1 μl de RNA total, con volumen final de 10 μl . Las biopsias medulares de testículo preservadas en nitrógeno líquido, fueron descongeladas lentamente a temperatura ambiente, se les agregó 1ml del reactivo TRIreagent® (Sigma Aldrich), para luego homogenizarlas con ayuda de un pequeño motor de uso odontológico (Powertec mini-grinder PT1403) a 15,000 rpm, usando cabezales abrasivos. Para evitar la contaminación cruzada después de cada muestra, el cabezal fue enjuagado profusamente con hipoclorito de sodio

al 2.5% y después con agua tratada con DEPC. El RNA total fue aislado siguiendo el protocolo recomendado por TRI reagent, indicado por el fabricante, con un volumen final de 50 µl para cada muestra extraída.. La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro (UNICO modelo: UV2100 Spectrophotometer), tomando la medida de absorbancia de A₂₆₀/A₂₈₀ correspondiente a 40 µg de RNA.

6.6.3.-Diseño de iniciadores.

Se diseñaron a partir de las secuencias aminoacídicas: *Mus musculus* (O70325, NP_032188.3, BAA22780.1); *Rattus norvegicus* (P36970, AAC52503.2, NP_058861.3); *Homo sapiens* (P36969, NP_002076.2, CAA50793.1, AAH46163.1); *Bos taurus* (Q9N2J2, NP_777195.1), *Sapajus apella* (Q4AEG9, BAE17021.1) y *Sus scrofa* (NM_214407.1, P36968, 999572.1). Estas secuencias fueron alineadas con el ClustalX v1.83. Posteriormente los iniciadores fueron analizados con el FastPCR Profesional v5.1.83 2006-2007 “PrimerDigital Ltd” y el IDT SciTools OligoAnalyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

6.6.4.-Formación del Acido desoxirribonucleico complementario (cDNA) y el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó en el termociclador “Multigene® TC9600” usando “Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas), a partir de 2 µl del RNA tratado con DNasas con volumen final de 20 µl usando en simultaneo “oligo dT primers” y “random primers”.

La estandarización de los cebadores se realizó en termociclador convencional (Termociclador MiniCycler™ MJ Research). Las condiciones de amplificación fueron: 1.67 mM de MgCl₂, 0.2 µM de dNTPs, 0.67 µM de cada primer, 0.2 M de Trehalosa (#T3663), 0.5 U de Taq Recombinante (Fermentas DreamTaq) y 2 µl de cDNA en un volumen final de 15 µl. Las condiciones de ciclaje fueron: Denaturación inicial por 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de: 95°C, 60°C, 72°C por 30 segundos cada temperatura, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos obtenidos fueron visualizados en gel de bis-acrilamida al 8 %

Se empleó el Kit de *Taq DNA Polymerase recombinant* (Fermentas). La mezcla maestra tenía las siguientes concentraciones: 1x amortiguador (buffer) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.6mM MgCl_2 , 1 μM iniciador directo, 1 μM iniciador reverso, 200 μM mezcla de nucleótidos (dNTPs), 0.5 μl Enzima *Taq*, en un volumen por reacción de 15 μl . El gen de GPx4 fue amplificado a partir de ácido desoxiribonucleico codificante (cDNA) obtenidas a partir de las biopsias de tejido testicular usando la técnica de la transcripción reversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RT). Para GPx4 las condiciones del ciclaje fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos de 95°C por 30 segundos, hibridación por 30 segundos a temperatura decreciente desde 61°C hasta 50°C a razón de 0.5°C por ciclo, más una extensión a 72°C por 30 segundos, y luego 17 ciclos a iguales condiciones con una temperatura de hibridación constante de 55°C.

Los datos del iniciador para GPx4 fueron:

FORWARD

5' ATGAAAGTCCAGCCCAAGG 3'

REVERSE

5' CACGGCAGGTCCTTCTCTAT 3'

Datos

FORWARD: 19pb, tm: 51.47, GC%: 52.63

REVERSE: 20pb, tm: 53.04, GC%: 55.0

Para este estudio se usó como gen referencial o housekeeping al gen RPLOP (que codifica para la proteína acídica ribosomal P0) de alpaca (HQ385999.1, previamente secuenciado y publicado por Tataje (2013) y Florentini (2014).

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, empleando ~9,6V/cm por 1 hora, teñidos con plata y visualizados posteriormente.

6.6.5.- Cuantificación relativa del gen GPx4

La cuantificación relativa se realizó mediante el procedimiento de PCR-RT en tiempo real con detección de SYBR Green con el sistema LightCycler 2.0 de Roche Applied Science, en donde el producto de PCR puede ser detectado y medido por la señal fluorescente del SYBR Green I.

El protocolo que se usó fue una mezcla de reacción de 20 µl de PCR que contenía: 2 µl de cDNA de la reacción de RT, 1.4 µl de MgCl₂ (1.5mM), 2 µl de cada primer (0.5 µM), 2 µl del Master DNA SYBR Green I (Roche) y 10.6 µl de agua de grado molecular, fueron agregados a los capilares y cargados al equipo LightCycler 2.0 de Roche Applied Science.

El PCR en tiempo Real se realizó con el sistema LightCycler® 480 II de Roche Applied Science con el fluorocromo “SYBR Green I”. El volumen final de la reacción de 12 µl: 4.8 µl de LightCycler 480 SYBR Green I Master; 6 µl de H₂O, PCR-grade, 10 µl de LightCycler 480 SYBR Green I Master, 1.2 µl de cada primer (0.5 µM), 1.2 µl de cDNA. Fue depositado en la placa de 96 pocillos, reaccionados y analizados en el LightCycler 480 II. Como gen referencial (housekeeping) se tomó el amplicón de 154 pb correspondiente al gen “*RPL0*” de alpaca (HQ385999.1, previamente secuenciado y publicado en NCBI por nuestro grupo) con duplicados técnicos empleando el promedio.

Para el protocolo de corrida se siguieron los parámetros recomendados por el kit “LightCycler 480DNA Master SYBR Green I” (Roche), con una temperatura de hibridación de 60 °C por 10 segundos (Tabla 1).

El análisis se realizó mediante el paquete libre LinRegPCR (<http://www.gene-quantification.de/LinRegPCR.zip>) (Ramakers *et al.* 2003). Este programa permite por medio de la transformación logarítmica de los datos crudos de la amplificación (ciclos vs fluorescencia), establecer una zona en la curva denominada “ventana de linealidad” la cual es analizable por regresión lineal. Partiendo de esta imagen es posible deducir principalmente dos cosas: 1) “la eficiencia de la amplificación”, obviando la necesidad de elaborar curvas de estandarización (Ruijter *et al.* 2009) y 2) finalmente, “la fluorescencia que tendría el transcrito inicial (cDNA)”, lo cual permitiría tener comparaciones válidas para cada individuo y gen problema.

Tabla 1. Temperaturas y ciclos empleados para cuantificación relativa por RT-qPCR en tiempo real.

Formato de detección		Tipo de bloque	Volumen de reacción	
SYBR Green		96	20 µl	
Programas				
Nombre		Ciclos	Modo de análisis	
Pre-Incubación		01	Ninguno	
Amplificación		45	Cuantificación	
Curva de denaturación		01	Curvas de denaturación	
Enfriamiento		01	Ninguno	
Temperaturas blanco				
Blanco (°C)	Modo de adquisición	Mantenimiento (hh:mm:ss)	Tasa de rampa (°C)	Adquisición (por °C)
Pre-Incubación				
95	Ninguno	00:05:00	4.4	-----
Amplificación				
95	Ninguno	00:00:10	4.4	-----
60	Ninguno	00:00:10	2.2	-----
72	Simple	00:00:10	4.4	-----
Curva de denaturación				
95	Ninguno	00:00:05	4.4	-----
65	Ninguno	00:01:00	2.2	-----
97	Continuo	-----	----	05
Enfriamiento				
40	Ninguno	00:00:10	1.5	-----

6.7.-Análisis estadístico.

Los valores porcentuales de la motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática pre y post congelamiento fueron transformados mediante la fórmula arco seno:

$$Y = \arcseno \sqrt{x}$$

Donde x representa los valores porcentuales de los parámetros evaluados (motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática).

Para la evaluación de la respuesta de la motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática se empleó un diseño completamente al azar. dichos valores de motilidad, viabilidad e integridad de membrana pre y post congelamiento fueron analizadas mediante ANOVA, cuyo modelo matemático lineal fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} =Respuesta traducida en parámetros de valoración de la calidad espermática (Motilidad, viabilidad e integridad de membrana)

μ =Media general.

T_i =Efecto del i-ésimo tratamiento (i = espermatozoide fresco/espermatozoide descongelado).

ξ_{ijk} =Error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza σ^2 DNI $\sim(0, \sigma^2$ DNI).

Para el análisis de los datos de cuantificación relativa del gen GPx4, se exploraron las posibles correlaciones entre las expresiones normalizadas halladas para este gen contra los datos de motilidad pre y post congelamiento mediante la prueba no paramétrica de Spearman, cuyo modelo matemático fue el siguiente:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

Donde:

R_s = Coeficiente de correlación (Spearman)

d =Diferencia entre los rangos

n= Número de datos

Los resultados del inmunolocalización de las proteínas GPx1 y GPx4 se clasificaron en: espermatozoides marcados (marca fluorescente a nivel de la cabeza para GPX1 y marca fluorescente a nivel de la pieza media del flagelo para GPx4) y espermatozoides sin marca fluorescente para ambos casos. Estas variables se analizaron mediante el siguiente modelo el cual permitió estimar si existían diferencias entre los resultados pre y post congelamiento:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Inmunomarcaje para GPx1 o GPx4.

μ =Media general.

T_i =Efecto del i-ésimo tratamiento (i = espermatozoide fresco/espermatozoide descongelado).

ξ_{ijk} =Error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza $\sigma^2_{DNI} \sim (0, \sigma^2_{DNI})$.

Los análisis fueron realizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 17.00 para Windows).

VII.-RESULTADOS

7.1.- Análisis de la calidad de los espermatozoides pre y post congelamiento mediante el uso de pruebas de rutina

En la tabla 2 se muestran los datos obtenidos pre y post al proceso de criopreservación, gráficamente en la figura No 4. Se observa un claro descenso en los valores de motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática ($p<0.05$)

7.2.-Análisis de la localización intracelular de las proteínas Glutation peroxidasa 1 y 4 (GPx1 y GPx4)

El patrón de localización (fluorescencia) de las proteínas fue el siguiente: Para la proteína GPx1 encontramos fluorescencia en la región de la cabeza (Figura No 5) tanto para los espermatozoides frescos y descongelados; para la proteína GPx4 encontramos fluorescencia en la región del flagelo cercana a la región de la pieza media (Figura No 6) en ambos grupos de muestras (espermatozoides frescos y descongelados), los datos obtenidos en porcentajes son mostrados en la tabla 3, encontramos un claro descenso ($p<0.05$) en la emisión de las fluorescencia para ambas proteínas en el grupo de los espermatozoides descongelados ($p<0.05$).

Tabla 2: Resultados de motilidad, viabilidad e integridad de membrana obtenidos antes y después del proceso de criopreservación*.

Tratamiento	Parámetros evaluados		
	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Integridad de la membrana plasmática (%)
Espermatozoides frescos	57.40±3.52 ^a	66.23±3.59 ^a	61.77±2.69 ^a
Espermatozoides descongelados	24.59%±1.65 ^b	32.93±1.78 ^b	39.40±1.75 ^b

*Los datos son presentados como \pm error estándar de la media. Los valores con diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

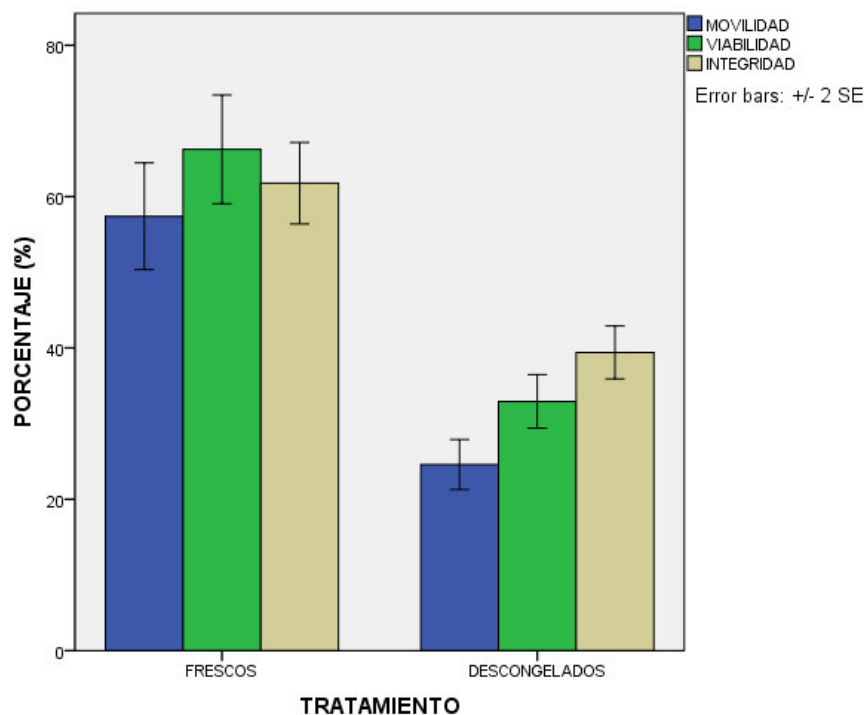


Figura No 4: Diferencias encontradas entre los porcentajes de motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática entre los espermatozoides frescos y criopreservados.

Tabla 3: Patrón de fluorescencia de los espermatozoides (%) de las proteínas GPx1 y GPx4 en muestras frescas y descongeladas.

Tipo de muestra	Fluorescencia para GPX1	Fluorescencia para GPX4
Espermatozoides frescos	71.34±0.69 ^a	65.23±0.67 ^c
Espermatozoides descongelados	45.2±0.83 ^b	32.6±0.44 ^d

Los datos son presentados como \pm error estándar de la media. Los valores con diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

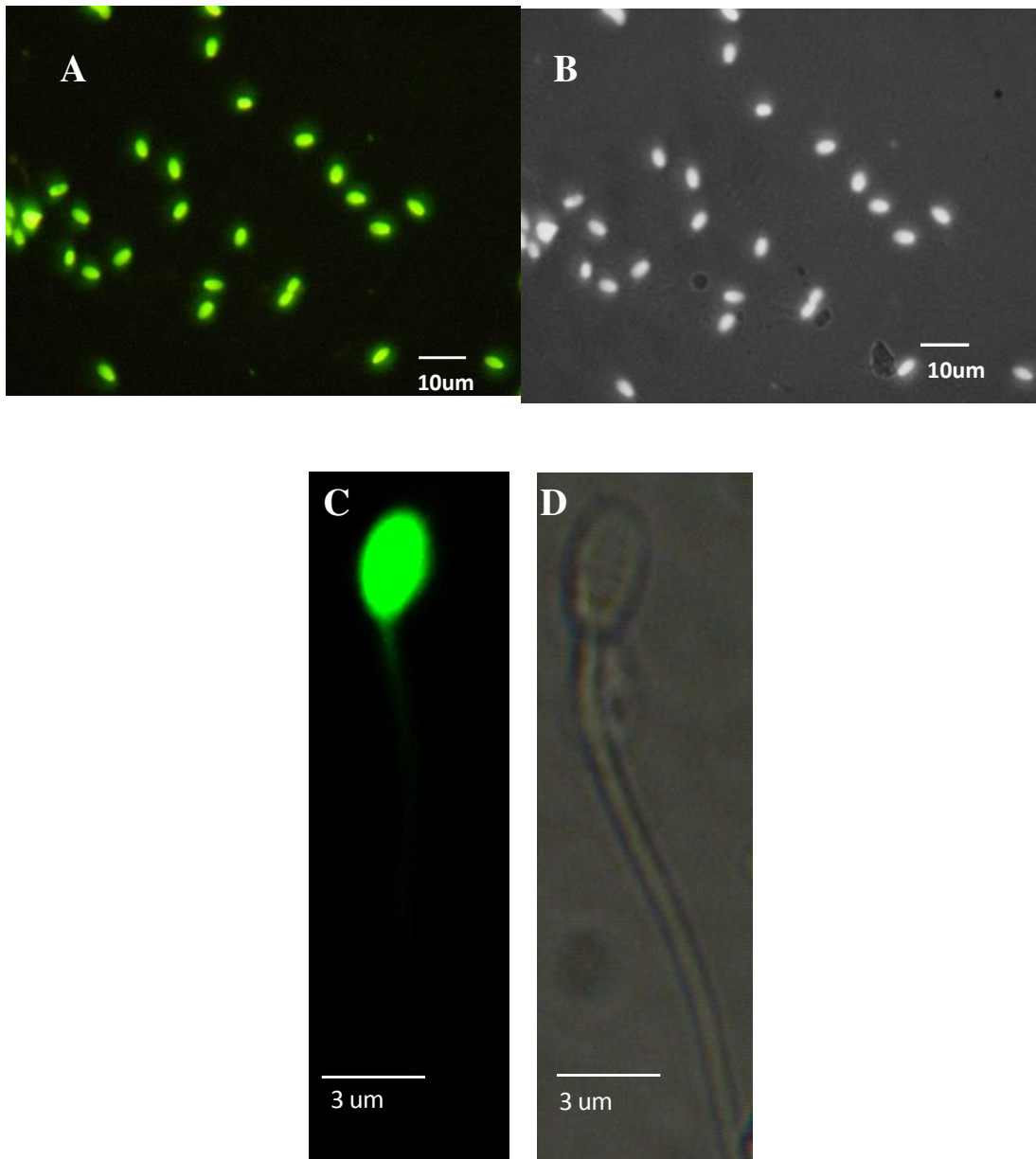


Figura No 5: Muestra de espermatozoides mostrando fluorescencia positiva para la proteína GPx1, (región de la cabeza). A: Patrón de fluorescencia (10X); B: La misma imagen de A pero observada en contraste de fases (10X). C: A mayor aumento (40X); D: La misma imagen de C pero observada en contraste de fases (40X).

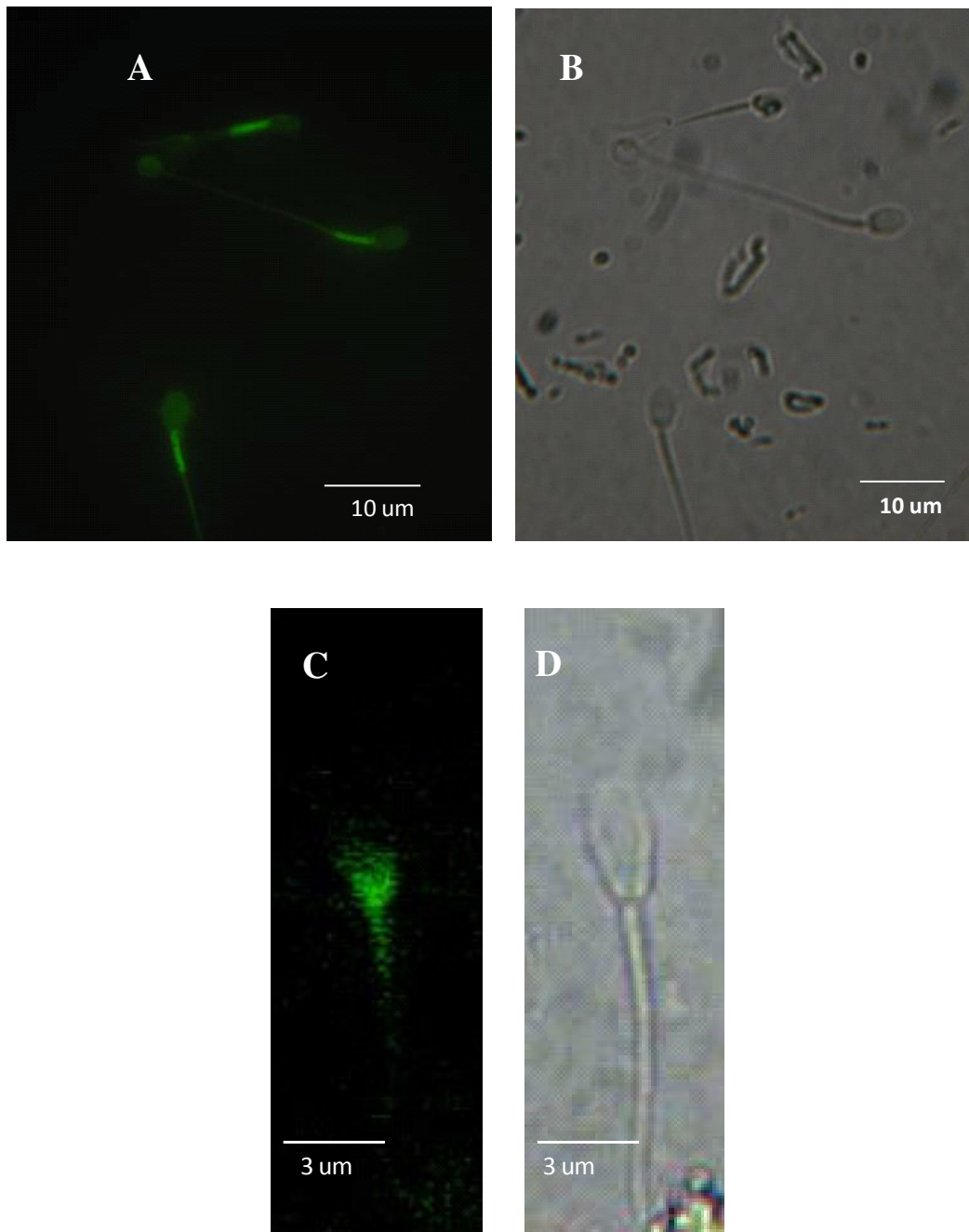


Figura No 6: Muestra de espermatozoides mostrando fluorescencia positiva para la proteína GPx4, (región de la pieza media). A: Patrón de fluorescencia (10X); B: La misma imagen de A pero observada en contraste de fases (10X). C: A mayor aumento (40X); D: La misma imagen de C pero observada en contraste de fases (40X).

7.3.-Análisis del estado de las proteínas Glutation peroxidasa 1 y 4 (GPx1 y GPx4)

La concentración de proteína que se usó fue de 8 µg de proteína por carril, observándose que las proteínas espermáticas se encontraron entre 20 kDa a 84 kDa (Figura No 7), luego se realizó un western blot para la identificación de las proteínas GPx1 y GPx4, en las figuras No 8 y No 9 se observan las bandas obtenidas con el western blott tanto para muestras de espermatozoides frescos así como para espermatozoides descongelados.

En el caso de GPx1, en los extractos de espermatozoides frescos se pudo identificar una banda de peso molecular de ~55 kDa y otras tres bandas de ~60 kDa, ~82 kDa y ~86 kDa, para los extractos de espermatozoides descongelados (DESC) se pudo identificar diversas bandas: ~43 kDa, ~55 kDa, ~62 kDa.

Se puso observar que el patrón de bandas de las muestras de espermatozoides frescos eran mucho más definidas e intensas (mayor concentración) encontrándose para GPx1 formas activas (~80 kDa), en el caso de las muestras de espermatozoides descongelados se pudo observar que las bandas obtenidas presentaban pesos moleculares de posibles formas inactivas (~43kDa, ~55kDa, ~62kDa).

En el caso de GPx4, en los extractos de espermatozoides frescos se pudo identificar una banda de peso molecular de ~27 kDa; para los extractos de espermatozoides descongelados se pudo identificar una banda de ~27 kDa.

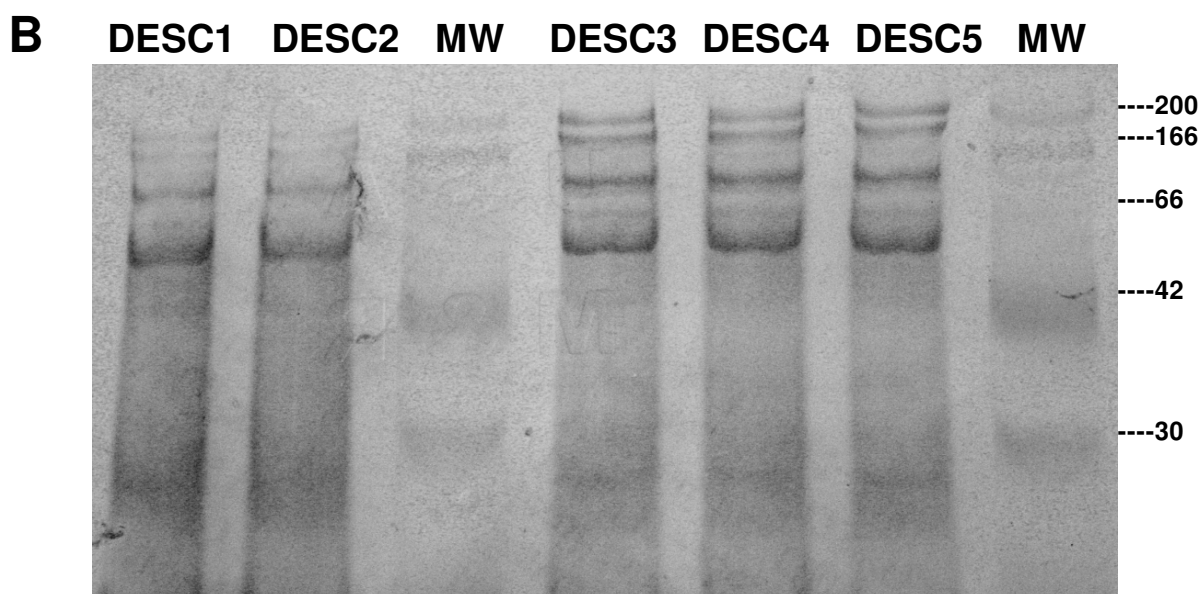
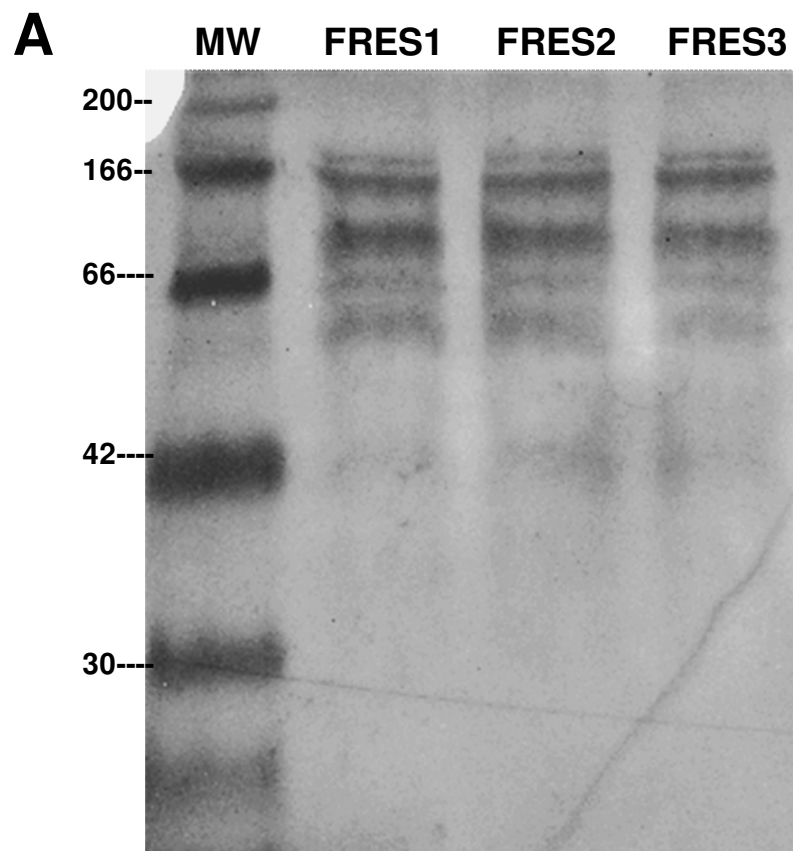
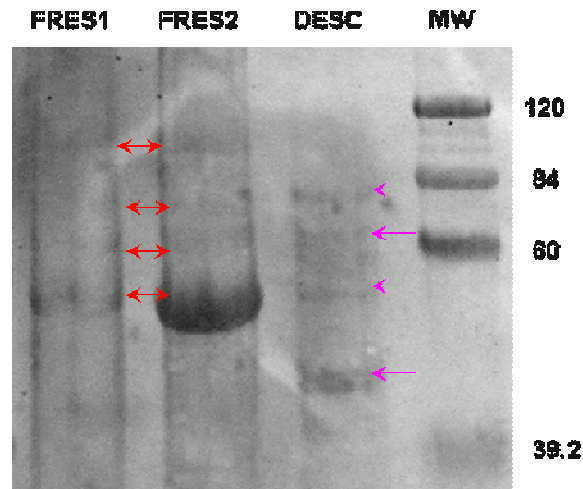


Figura No 7: Patrón electroforético de proteínas de extractos de espermatozoides, coloreados con plata. A: Extractos de proteínas de espermatozoides sin criopreservar (FRES: Frescos), B: Extractos de proteínas de espermatozoides criopreservados (DESC: Descongelados), MW: Marcador de peso molecular.

A



B

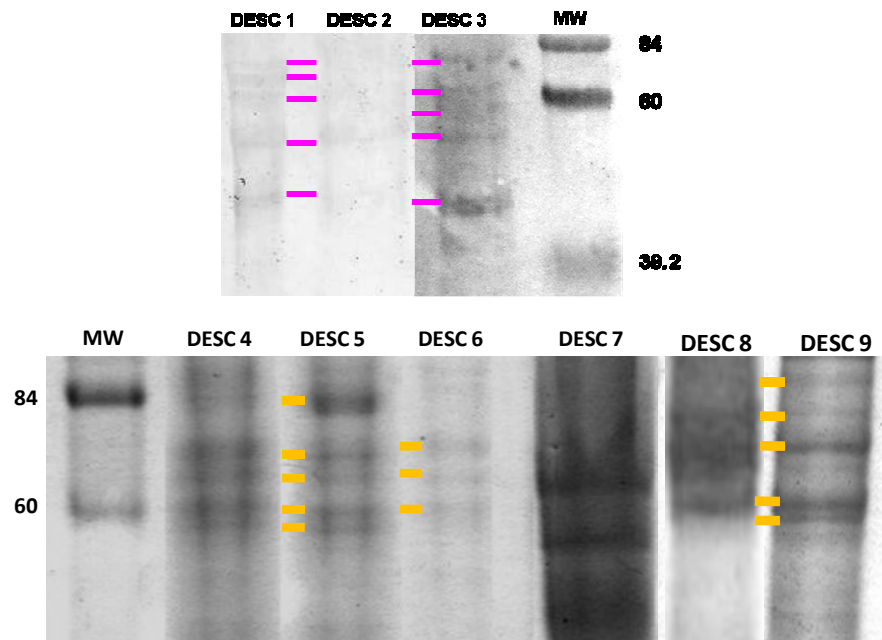


Figura No 8: Detección por western blott de las proteínas GPx1 en espermatozoides frescos y criopreservados. Se observa las bandas obtenidas cuando se usó el anticuerpo primario anti GPx1 (RabMas, ABCAM). A: Extractos de espermatozoides frescos (FRES: Fresco), se pudo identificar una banda de peso molecular de ~55 kDa y otras tres bandas de ~60 kDa, ~82 kDa y ~86 kDa., B: Espermatozoides criopreservados: Para los extractos de espermatozoides descongelados (DESC) se pudo identificar diversas bandas: ~43 kDa, ~55 kDa, ~62 kDa.

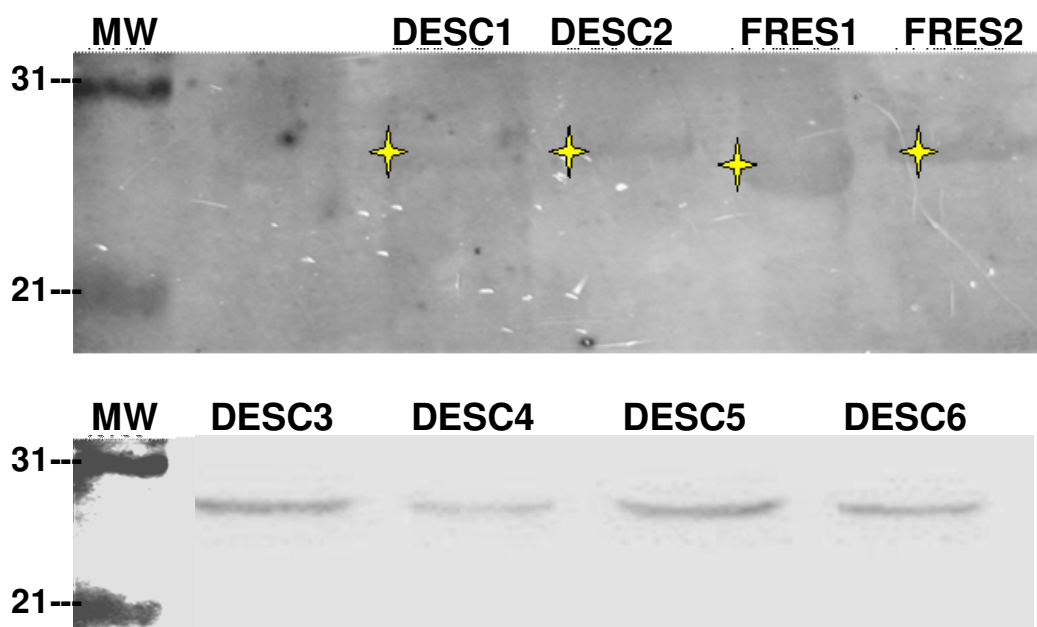


Figura No 9: Detección por western blott de las proteínas GPx4 en espermatozoides frescos y criopreservados. Se observa las bandas obtenidas cuando se usó el anticuerpo primario anti GPx4 (RabMas, ABCAM). Se observa las bandas obtenidas luego del procedimiento de western blot, se usó el anticuerpo primario anti GPx4 (RabMas, ABCAM). En los extractos de espermatozoides descongelados (DESC) se pudo identificar una banda de ~27 kDa, en los extractos de espermatozoides frescos (FRES) se pudo identificar una banda de peso molecular de ~27 kDa.

7.4.- Cuantificación de los niveles de expresión a nivel transcripcional del gen GPx4.

Se logró estandarizar la obtención y formación de cDNA, se usaron iniciadores específicos para el gen GPx4, el tamaño de amplificado fue de 170 pb, se usó como gen control o *Housekeeping* el gen RPLOP cuyo tamaño de amplificado fue de 154 pb, en la figura No 10 se muestra los patrones electroforéticos obtenidos de los amplificados.

La cuantificación relativa se realizó mediante el procedimiento de PCR-RT en tiempo real con detección de SYBR Green con el sistema LightCycler 2.0 de Roche Applied Science, para el cálculo de la cuantificación relativa se aplicó un modelo matemático sigmoideal que ajusta adecuadamente todo el proceso cinético

de PCR en tiempo real por el programa de libre acceso LinRegPCR, los datos de cuantificación relativa obtenidos son mostrados en la tabla 4.

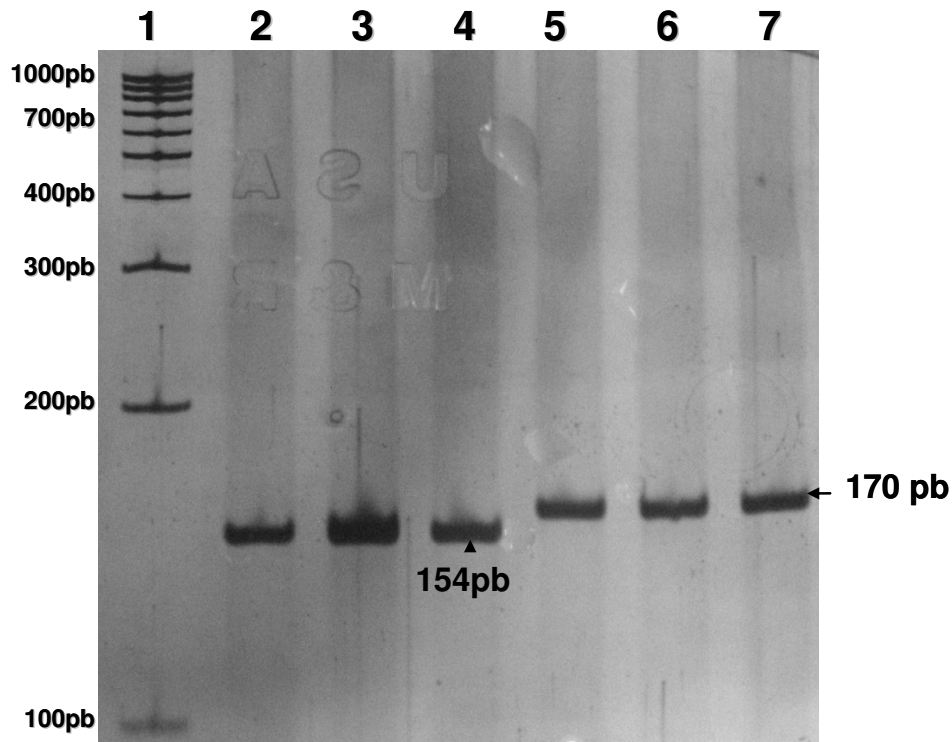


Figura No 10: Patrones electroforéticos de amplificadores para GPX4 (Banda de 170 pb) a partir de amplificadores sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con plata. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2,3 y 4: Muestras de tejido testicular donde se muestra la banda del amplificado para el gen control (*Housekeeping: RPLP0*); Carril 5,6 y 7: Muestras de tejido testicular donde se muestra la banda del amplificado para el gen GPx4.

Los datos del nivel de expresión del gen GPx4 así como la motilidad pre y post congelamiento son mostrados en la figura No 11 y tabla 4, se puede observar un claro descenso en la motilidad posterior al proceso de criopreservación (descongelamiento), también se observa el nivel de expresión diferencial del gen GPx4 entre los distintos individuos, siendo mayor la expresión cuando el nivel de motilidad espermático es mayor (Ind.12, Ind.9, Ind. 14, Ind. 15, Ind. 24, Ind. 8, Ind. 16) y menor cuando el nivel de motilidad es menor (Ind.23, Ind. 29, Ind. 27, Ind. 28, Ind. 17 e Ind. 30).

Tabla 4: Nivel de expresión molecular relativa del gen GPx4 determinada por PCR-RT en tiempo real

Individuo	Expresión relativa del gen GPx4	Motilidad pre congelamiento (%)	Motilidad post congelamiento (%)
1	2.34	48	16
2	4.42	52	28
3	2.01	47	16
4	3.57	55	21
5	4.15	55	27
6	3.82	60	25
7	3.18	75	31
8	6.8	90	38
9	4.89	80	36
10	4.53	60	23
11	5.12	60	29
12	7.39	75	39
13	3.7	65	23
14	7.5	85	30
15	5.6	85	32
16	7.15	90	41
17	2.34	43	15
18	5.42	45	15
19	6.01	50	21
20	5.57	54	21
21	5.15	38	19
22	4.82	54	29
23	3.08	20	10
24	3.18	88	45
25	0.09	48	24
26	4.89	65	23
27	3.15	30	10
28	2.32	32	20
29	0.22	28	13
30	1.2	45	19

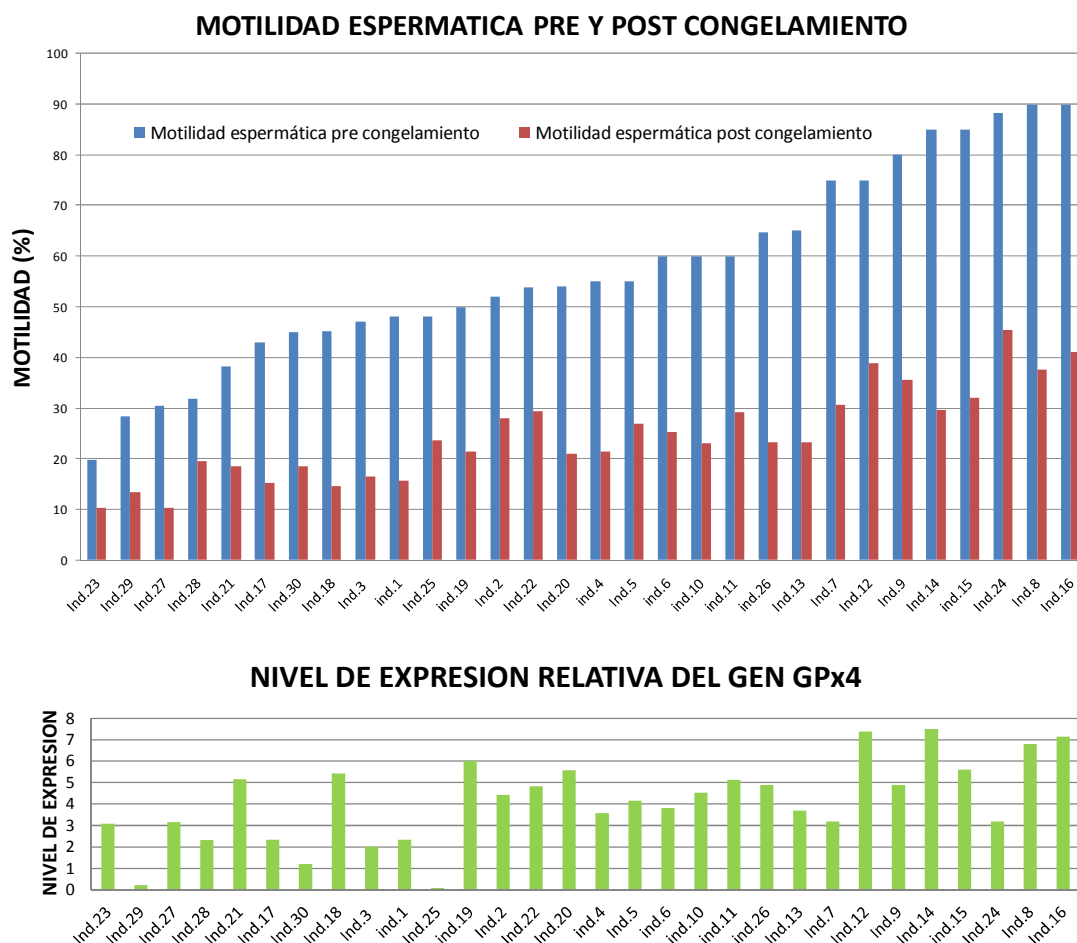


Figura No 11: Relación entre la expresión molecular relativa del gen GPx4 con la motilidad en espermatozoides frescos y descongelados. Donde Ind.: Individuo.

El nivel de expresión relativa del gen GPx4 y la variación de la motilidad pre y post congelamiento fueron correlacionados debido a que la proteína GPx4 es la principal proteína encargada de brindar la energía necesaria para el proceso de motilidad espermática, y cumple también el rol de formar parte de la pieza media del espermatozoide (parte importante para la motilidad espermática), para ello se usó el coeficiente Rho de Spearman (tabla 5), encontrando que existe una relación positiva y significativa ($p < 0.01$) entre la motilidad pre y post congelamiento y el nivel de expresión del gen GPx4.

Tabla 5: Correlación entre la Motilidad Pre y Post congelamiento y la expresión génica del gen Gpx4

Parámetro	Valor r (correlación de rangos)
Motilidad espermatozoides frescos (Pre congelamiento)/Nivel de expresión del gen GPx4	0.607*
Motilidad espermatozoides descongelados (Post congelamiento) /Nivel de expresión del gen GPx4	0.550*

*Diferencia significativa ($p < 0.01$)

VIII.-DISCUSION DE RESULTADOS

La criopreservación de semen de alpaca ha tenido un progreso un poco desalentador, comparado con otras especies domesticas (Vaughan et al. 2003, Santiani et al. 2005); el uso reciente de espermatozoides del epidídimo para desarrollar técnicas de congelamiento optimas han cambiado la percepción sobre el espermatozoide y brinda luces en la fisiología de esta célula.

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el efecto del proceso de criopreservación (congelamiento lento) sobre las proteínas GPx1 y GPx4 de espermatozoides epididimarios de alpacas macho. Se usaron muestras de individuos machos de 4 años de edad, los valores de longitud (4.61 ± 0.69 cm) y peso (14.01 ± 0.50 g) de los testículos se encontraron dentro de los valores normales reportados por otros autores (Sumar 1983, Fowler 1998, Galloway 2000), dichos valores no influenciaron en los resultados del presente estudio ya que se usaron adultos machos que han alcanzado su madurez sexual (Sumar 1983, Fernández-Baca 1993, Fowler et al. 1998) y por ende el nivel de expresión de las proteínas GPx1 y Gpx4 es óptimo y normal en individuos adultos como se reporta en rata (Weir y Robaire, 2007) y humanos (Meseguer et al. 2004).

Se procedió a criopreservar espermatozoides de la cola del epidídimo de alpaca mediante una metodología de congelamiento lento para ello se usó el medio Tes Tris Yolk para el congelamiento, este medio ha sido usado en otros animales como en toro (Vishwanath y Shannon 2000), alce (Leboeuf et al. 2000), carnero (Evans y Maxwell 1987), también en camélidos como alpaca (Vaughan et al. 2003), camello (Niasari-Naslaji et al. 2006) y llama (Ratto et al. 1999); el agente crioprotector permeable usado fue Dimetilacetamida a la concentración de 0.375M, el cual ha sido usado en otras especies como conejo (Dalimata y Graham 1997, Okuda et al. 2007), jabalí (Kim et al. 2011) tortuga, peces (Tiersch et al. 2004, Vuthiphandchai et al. 2009, Yang et al. 2010), canguro (McClean et al. 2008), caballo (Medeiros et al. 2002, Squires et al. 2004) y koala (Zee et al. 2008, Johnston et al. 2012) en los cuales la concentración de DMA variaba entre 0,25M y 1.25M, encontrando valores post congelamiento de motilidad de 45%, viabilidad de 58%, e integridad de membrana plasmática de 60%; nosotros usamos a 0.375M (Canorio et al. 2009). La velocidad de enfriamiento usada fue de 4°C/min

a 7°C/min, los puntos de temperatura durante el enfriamiento fueron +4°C, -2°C, -30°C y -80°C, los cuales son puntos estándares en las curvas de congelamiento lento de espermatozoides de otras especies (Willadsen et al. 1976; Curry et al. 1994).

Dentro de los resultados postdescongelamiento encontramos que la integridad de membrana había disminuido (45%) como lo observado en otras especies (Rasul et al. 2001; Holt y North 1994; Shannon y Vishwanath 1995), afectando directamente los porcentajes de viabilidad que también fueron menores (37%). La motilidad fue uno de los parámetros seriamente afectados (Watson et al. 1995), por lo tanto, siendo parcialmente dependiente de la función mitocondrial (Kao et al. 1998), presentó un descenso post congelamiento, a un valor promedio de 28% de motilidad debido posiblemente a daños a nivel de la mitocondria (Jones y Stewart 1979) y al axonema (Courstens et al. 1989). Nuestros resultados son similares a los encontrados por otros autores (Valdivia et al. 2003; Santiani et al. 2005; Morton et al. 2010); los cuales usaron como agente crioprotector al glicerol y la metodología usada fue de congelamiento rápido, cuyos valores de motilidad post congelamiento se encontraba entre 20-35%, viabilidad 50% e integridad de membrana 60%.

El proceso de criopreservación de espermatozoides es una técnica ampliamente usada para poder conservar material genético de especies de importancia, los resultados post congelamiento revelan que existe la asociación entre el estrés oxidativo producto del proceso de criopreservación y la función espermática (Cormier et al. 1997; Pommer et al. 2003) ocurriendo un descenso en los parámetros de viabilidad, integridad de membrana plasmática y motilidad espermática debido a alteraciones que sufre el espermatozoide durante el congelamiento, recibiendo este fenómeno el nombre de proceso de criocapacitación. Para poder medir el efecto de la peroxidación producida durante el proceso de criopreservación se han evaluado diversos sistemas antioxidantes propios de los espermatozoides (Agarwal, 2002; Turner y Lysiak, 2008), especialmente las proteínas GPx1 y GPx4 integrantes de la familia de Glutathion Peroxidasa (Chabory et al. 2010, Noblanc et al. 2011). En el presente trabajo determinamos por inmunofluorescencia la localización de las proteínas glutathion peroxidasas 1 (GPx1) y 4 (GPx4) en muestras frescas y descongeladas de

espermatozoides epididimarios de alpaca, para poder determinar la localización y posible variación en la expresión de estas proteínas por efecto del proceso de criopreservación. En el caso de la proteína GPx1 se pudo observar que la distribución de esta proteína era principalmente en la región de la cabeza del espermatozoide pre y post congelados, lo cual también fue evidenciado en otras especies (Vaisberg et al. 2005; Jelezarsky et al. 2008), pero encontramos un porcentaje menor de espermatozoides que presentaban la fluorescencia luego del proceso de criopreservación ($p < 0.05$). Para el caso de la proteína PHGPX o GPX4 se pudo observar que la distribución de esta proteína era principalmente en la región del flagelo del espermatozoide pre y post congelamiento, un patrón similar que es presentado en espermatozoides de *Ovis aries* que han sido criopreservados (Marti et al. 2008), no hubo variación en la distribución de la proteína, el porcentaje de espermatozoides con el marcaje positivo fue menor en los espermatozoides descongelados que en los frescos, siendo estas diferencias significativas ($p < 0.05$). Estos cambios en el porcentaje de espermatozoides con el marcaje positivo luego del proceso de criopreservación podría deberse a alteraciones a nivel de la membrana plasmática durante el proceso de criopreservación que provocaría la alteración de la maquinaria proteica de GPx1 y GPx4 (Lasso et al. 1994; Marti et al. 2008).

La proteína GPx1 actúa como un tetrámero cuyo peso molecular es de aprox. 88 kDa, cada monómero presenta un peso molecular aprox. de 20-27 kDa (Jelezarsky et al. 2008); en los extractos de espermatozoides frescos (FRES 1 y FRES 2) se pudo identificar una banda de peso molecular de ~55 kDa y otras tres bandas de ~60 kDa, ~82 kDa y ~86 kDa. Para los extractos de espermatozoides descongelados (DESC) se pudo identificar diversas bandas: ~43 kDa, ~55 kDa, ~62 kDa. Normalmente la proteína GPx1 actúa como un tetrámero, es de esta forma que se presenta en forma activa; por lo cual podemos mencionar que nuestros datos indican que en los extractos de espermatozoides frescos estamos encontrando las formas activas y posibles dímeros y trímeros, y en el caso de los espermatozoides descongelados encontramos sólo posibles monómeros de la misma (dímeros y trímeros) siendo estas formas inactivas (Maiorino et al. 2003), indicando que la proteína ha sido afectada por el estrés generado durante el proceso de criopreservación (estrés oxidativo), otros autores han encontrado variaciones y alteraciones de GPx1 durante el proceso de criopreservación y cuya

alteración es producto del mismo proceso de criopreservación, por ende no se podría encontrar formas activas de la misma (Meseguer et al. 2004; Garrido et al. 2004; Meseguer et al. 2006), más aun comparten la perspectiva de que esta variación podría ser usada en el futuro en los estudios de maduración espermática e identificación del nivel de fertilidad de individuos machos (Torres et al. 2014; Vilorio et al. 2010).

Para el caso de la proteína GPx4, esta se presenta como un monómero cuyo peso molecular a nivel de espermatozoides en otras especies se encuentra entre 22-27 kDa (Maiorino et al. 2003). En los extractos de proteínas de espermatozoides frescos se pudo identificar una banda de peso molecular de aproximadamente 27 kDa; para los extractos de espermatozoides descongelados también se pudo identificar la misma banda, la diferencia entre los grupos de espermatozoides frescos y descongelados radicó en la intensidad de dicha banda, siendo menor en el caso de los espermatozoides descongelados, es decir se pudo encontrar formas activas de esta proteína como se observó también en espermatozoides de carnero (Marti et al. 2013), humano (Lasso et al. 1994) cerdo (Pena et al. 2006), rata (Tramer et al. 1998) y peces (Li et al. 2010).

La alteración de las proteínas antioxidantes debido al proceso de criopreservación ha sido reportado en carnero (Marti et al. 2008), humano (Lasso et al. 1994) cerdo (Pena et al. 2006) y se ha demostrado que la evaluación de la concentración y estado de GPx1 y GPx4 han servido como predictores de la calidad espermática (motilidad) post congelamiento (Meseguer et al. 2004; Meseguer et al. 2006), aunque hasta el momento no se ha podido determinar el rol y las vías que usan estas proteínas durante el estrés producto del proceso de congelamiento. Los resultados de nuestro estudio indican que el proceso de criopreservación induce cambios sobre las proteínas GPx1 y GPx4 del espermatozoide epididimario de alpaca, dichos cambios también se presentan en sistemas proteicos de otras especies como en el caso de especies como el toro en las cuales se observó la caída y alteración de la proteína GPx1 (Bilodeau et al. 2000) pero en espermatozoides criopreservados de humano y de gallo el nivel del complejo proteico GPx se mantuvo estable (Lasso et al. 1994, Marti et al. 2008). En nuestro estudio mediante la técnica de western blott pudimos observar que las proteínas GPx1 y GPx4 fueron afectadas por el proceso de criopreservación ya que obtuvimos bandas de formas inactivas o incompletas de la proteína GPx1 y en el

caso de GPx4 encontramos bandas de la forma activa pero con la concentración disminuida (medida por la intensidad de las bandas obtenidas por western blott) en el caso de los extractos proteicos de muestras descongeladas.

Las proteínas son blanco también del efecto de las ERO, pero su efecto es menos estresante que en el caso de los lípidos, mayormente pueden causar oxidación de los aminoácidos, ruptura de los enlaces peptídicos, pérdida de la actividad catalítica, daño en la integridad de proteínas estructurales. Las proteínas glutatión peroxidasa GPx1 y GPx4 tienen un aminoácido raro: la selenocisteína, este aminoácido tiene una estructura similar a la de la cisteína pero con un átomo de selenio tomando el lugar de los habituales de azufre formando un grupo selenol, el cual es esencial para la actividad peroxidasa de estas proteínas, este aminoácido es parecido al aminoácido cisteína en términos de propiedades químicas, pero tiene una mayor reactividad, por lo cual es un potente agente antioxidante (Asahi et al. 1997), de acuerdo a nuestros resultados GPx1 estaría sufriendo ruptura de los enlaces peptídicos de las subunidades por lo cual encontramos formas inactivas.

Aún no ha sido identificado el mecanismo responsable de la alteración de los sistemas antioxidantes en los espermatozoides criopreservados, Lasso et al. (1994) sugiere que el daño a nivel de membrana plasmática y subsecuentemente de los organelas durante el proceso de criopreservación puede ser responsable de la alteración de estos sistemas antioxidantes, dicha alteración puede conllevar a la inactivación de dichos sistemas pero no llegaría a un proceso de desnaturalización total de los sistemas antioxidantes, encontrándose formas inactivas de estas proteínas. Para ambos análisis (proteínas GPx1 y GPx4) cabe resaltar que estos espermatozoides son de la cola del epidídimo cuyo estado de maduración es avanzado pero no son iguales en maduración a los espermatozoides obtenidos a partir de muestras de semen (maduración final) y la mayoría de trabajos sobre este tipo de proteínas lo realizan en muestras de semen (Foresta et al. 2002).

Asimismo procedimos a evaluar a nivel molecular la expresión del gen GPx4, la importancia de la expresión genética y molecular de GPx4 (Aitken y Clarkson 1987; Agarwal 2002; Foresta et al. 2002; Mariorino 2003; Hirotaka et al. 2001) se centra principalmente en que su deficiencia está relacionada con la supresión de la espermatogénesis (Foresta et al. 2002), también tiene una función

estructural de protección de la pieza media del espermatozoide, lugar donde se acumula e influencia sobre la motilidad espermática (Mariorino, 2003).

Es por ello que la identificación del gen de GPx4 en alpaca resulta muy alentadora como posible uso en el campo de biomarcadores de criocapacitación y motilidad espermática; en los estudios moleculares mediante la amplificación del gen GPx4 por PCR convencional se logró obtener patrones electroforéticos de este amplificado, identificándose un tamaño de banda de 170 pb para el gen GPx4 y de tamaño de banda de 154 pb para el gen RPLOP (*housekeeping* o control), cabe destacar que la proteína GPx4 es la mayor selenoproteína de las células espermátogénicas y espermatozoides en diversas especies y su gen es expresada altamente a nivel testicular, los datos encontrados concuerdan con los datos obtenidos en otras especies.

El análisis del nivel de expresión molecular relativa del gen GPx4 fue realizada mediante la prueba de PCR-RT en tiempo real usando la metodología de SYBR GREEN, y analizadas por el software planteado por Ramakers (2003), observamos diferentes niveles de expresión entre los individuos estudiados, es decir una expresión diferencial, estos datos fueron analizados y correlacionados con los datos de motilidad presentados por los espermatozoides frescos ya que la proteína GPx4 dentro del espermatozoide cumple con la función de protección de la pieza media la cual genera la energía necesaria para la motilidad del espermatozoide además de ser la proteína que mantiene la estructura y formación de la región de la pieza media. Nuestros datos muestran que la expresión del gen es mayor en individuos con un valor de motilidad mayor.

Los resultados hallados en nuestro trabajo con respecto a la correlación entre los patrones de motilidad espermática y la expresión génica nos indican que la expresión del gen GPx4 en alpaca está correlacionada positivamente, aunque de forma débil y significativa con la motilidad antes del congelamiento ($r= 0,607$) y de una forma débil pero significativa con la motilidad post congelamiento ($r= 0,55$). De ello se infiere que a mayor expresión génica de GPx4 mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, que es la encargada de la migración de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra.

No hay duda que el mejoramiento de las técnicas de criopreservación del espermatozoide de alpaca contribuirá en el desarrollo de los programas de mejora genética de esta especie y probablemente pueda ser aplicado en otras especies

de camélidos sudamericanos como la llama y la vicuña. El sistema de antioxidantes en espermatozoides de mamíferos ha sido ampliamente estudiado (Álvarez y Storey 1989; Zini et al. 1993); sin embargo existe poco conocimiento sobre este grupo de proteínas en espermatozoides de camélidos sudamericanos, por lo cual resulta de importancia evaluar y correlacionar las variaciones de GPx1 y GPx4 como posibles biomarcadores de criocapacitación o supervivencia durante el proceso de criopreservación.

IX.-CONCLUSIONES

1. La ubicación de las proteínas GPx1 (Cabeza del espermatozoide) y GPx4 (Flagelo del espermatozoide) demuestran sus funciones de protección de las principales piezas del espermatozoide de alpaca (viabilidad y motilidad).
2. La distribución intracelular de la proteína GPX1 no se vio afectada por el proceso de criopreservación, pero encontramos mayormente formas inactivas (dímeros y trímeros).
3. La distribución intracelular de la proteína GPx4 no se vio afectada por el proceso de criopreservación y se pudo obtener formas activas pre y post congelamiento.
4. Los parámetros de motilidad, viabilidad e integridad de membrana se ven afectados por el proceso de criopreservación, evidenciándose una disminución en los porcentajes pre y post congelamiento.
5. Existe una relación positiva y significativa entre el nivel de expresión relativa del gen GPx4 respecto a la motilidad espermática.

X.-RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios sobre la actividad pre y post congelamiento de las proteínas GPx1 y GPx4.
2. Evaluar el nivel de expresión del gen GPx1 en biopsias de tejido testicular.
3. Se recomienda un estudio a futuro sobre el uso de antioxidantes, como aditivos al proceso de criopreservación, y evaluar el efecto de estos antioxidantes sobre el sistema de proteínas glutatión peroxidasa (GPx1 y GPx4).
4. Se recomienda hacer un estudio de otros sistemas antioxidantes presentes en los espermatozoides (catalasa y superóxido dismutasa).
5. Se recomienda la comparación de la presencia de estas dos proteínas GPx1 y GPx4 en espermatozoides extraídos de semen.
6. Se recomienda en estudios futuros poder evidenciar el uso de ambas proteínas como biomarcadores de calidad espermática durante el proceso de criopreservación.

XI.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agca Y.; Gilmore J.; Byers M.; Woods E.; Critser J. 2002. Osmotic Characteristics of Mouse Spermatozoa in the Presence of Extenders and Sugars. *Biology of Reproduction* 67, 1493-1501.
- Aitken R.; Clarkson J. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 459 –469.
- Almilid T and Johnson L. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim.* 66:2899-905
- Alvarenga M.; Papa F; Landim-Alvarenga F; Medeiros A. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 105–113.
- Alvarez J and Storey B. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research.* 23:77-90.
- Amann, R and Hammerstedt R. 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction.* 23:647.
- Asahi M., Fujii J, Takao T., Kuzuya T., Hori M., Shimonishi Y, and Taniguchi N. 1997. The Oxidation of Selenocysteine Is Involved in the Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide Donor. *Journal of Biological chemistry.* 272: 19152-19157.
- Austin C. 1951. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Science. Res 4 (Series B)* 581-596
- Bailey J and Berube B. 1998. Mechanisms of cryopreservation-induced capacitation of bovine sperm. *Journal of Andrology,* , 20:13.
- Bailey J.; Jean-Fran L; Bilodeau O.; Cormier N. 2000. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology* 21: 215-222.

- Ball B; Medina V.; Gravance C; Baumber J. 2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589.
- Bedford S.; Varner D.; Meyers S. 2000. Effects of cryopreservation on the acrosomal status of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 56:133-140
- Blanco J.; Gee G.; Wildt D.; Donoghue A. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Journal of Biology of Reproduction* 63(4):1164-71
- Bravo P.W., C. Ordonez V. Alarcón. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. In: 13th ICAR, Sydney, Australia.
- Bravo P., Flores U., Garnica J., Ordonez C. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*. vol. 47, pp. 619-626.
- Bravo P.; Ccallo M.; Garnica J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Rumin. Res.* 38, 91–95
- Brown B. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*. vol. 58, 169-195.
- Buhr M; Curtis E; Kakuda N. 1994. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, , 31:224-238.
- Canorio N. 2009. Criocapacitación del espermatozoide de Alpaca (*Lama pacos*), Tesis para optar el grado de magister, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú, 150pp.
- Canorio N.; Tataje L.; Valdivia M. 2010. Expresión Testicular de Hidroperoxidasa de Fosfolípidos en Alpaca (*Lama pacos*) y su correlación con la motilidad espermática pre y post congelamiento. Libro de Resúmenes de la XIX Reunión Científica 32.
- Chabory C.; Damon A.; Lenoir J.; Henry-Berger P.; Vernet, R.; Cadet F. 2010, Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and

- maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science* 88:1321-1331.
- Chang M. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168:697-698.
 - Collin S; Sirard M; Dufour M; Bailey J. 2000. Sperm Calcium Levels and Chlortetracycline Fluorescence Patterns are Related to the In Vivo Fertility of Cryopreserved Bovine Semen, *Journal of Andrology*, , Vol. 21, No. 6.
 - Cormier N; Sirard M; Bailey J L. 1997. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation, *Journal of Andrology*, Vol. 18, No. 4.
 - Cormier N.; Bailey J. 2003 A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa *Biology of Reproduction* 69:177–185.
 - Courtens J.; Ekwall H.; Paquignon M.; Plöen L.1989. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* 87:613-626.
 - Curry M; Millar J.; Watson P. 1994. Calculated Optimal Cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biology of reproduction* 51, 1014-1021.
 - Dalimata A.; Graham J. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 49: 831–841.
 - Dandekar S.; Graham E.; Plant G. 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *Journal of Postgrade Medicine* 48:186 -190.
 - De Haan J.; Bladier C.; Griffiths P. 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, GPx1, show increase susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Journal of Biology and Chemistry* 273: 22528 - 22534.

- Donnelly E.; Lewis S.; McNally J.; Thompson W. 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome., *Fertility and Sterility* 70: 305–314
- Evans G.; Maxwell W.. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney, Australia.
- Elwishy, A. 1988. Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review, *Animal Reproduction Science*. vol. 17, pp. 217-241.
- Fernandez-Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science* 33:307-323.
- Florentini A. 2014. Niveles de expresión de DCXR en tejido gonadal de alpacas macho. Tesis para optar el título de Biologo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú,
- Foresta C.; Flohe L.; Garolla A.; Roveri A.; Ursini F.; Maiorino M. 2002. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of Reproduction* 67:967-71.
- Fowler ME, Bravo PW. 1998. Reproduction. In: Fowler ME, *Medicine and surgery of South American camelids*. 2nd edition. Iowa State University Press, Ames, pp381-429.
- Galloway DB. 2000. The development of the testicles in alpacas in Australia. *Proceedings of the Australian Alpaca Industry Conference*. Canberra. pp21-23.
- Gao D.; Mazur P.; Crister J. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. San Diego, CA: Academic Press, pp. 263 -328
- Garner, D.L. and Hafez, E.S.E., 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*, seventh ed. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 96–117.
- Garnica J., Achata R., Bravo P. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*. vol. 32, pp. 85-90.

- Garrido N; Meseguer M; Alvarez J; Simón C; Pellicer A; Remohí J. 2004. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 82 Suppl 3:1059-66.
- Graham E.; Crabo F. and Brown K. 1972. Effect of some hydrogen buffers on the freezing and storage of bull spermatozoa, *Journal of Dairy Science*, , 55:372.
- Green C. and Watson P. 2001 Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation, *Reproduction* 122:889-898
- Guthrie H. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 1811-1816
- Hay M.; King W.; Gartley C.; Leibo S.; Goodrowe K. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 51:99–108.
- Hernández-Matos Y, Delgado-Roche L., López-Pérez R., Martínez-Sánchez G, Mallok A.. 2010. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 18 pp 153-158
- Hirotaka I.; Kunio S.; Kazuhiro I.; Shizuko I.; Hiroyuki O.; Isao O.; Kazuo E.; Masato U.; Yasuhito N. 2001 Failure of the Expression of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Spermatozoa of Human Infertile Males. *Biology of Reproduction* 64:674-683.
- Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62: 3–22.
- Holt C.; Holt W.; Moore H.; Reed H. C.; Curnock R. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, , 18, 312-323.
- Holt W. and North R. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma

- membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction* 51: 414-424.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2012. IV Censo Nacional Agropecuario (IV CENAGRO), Lima Perú.
 - Jelezarsky L; Vaisberg C; Chaushev T; Sapundjiev E. 2008. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology*. 15.69(2):139-45.
 - Johnston S.; Zee Y.; López C.; Gosálvez J. 2012. The Effect of Chilled Storage and Cryopreservation on the Sperm DNA Fragmentation Dynamics of a Captive Population of Koalas. *Journal of Andrology* 33(5):231-240.
 - Jones R. and Stewart D. 1979. The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 56:233-238.
 - Kao S.; Chao H.; Wei Y. 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 657-666
 - Kim S.; Lee Y.; Ji D.; Kim J. 2011. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *Journal of Veterinary Medicine Science* 73(7):961-3.
 - Lasso J; Noiles E; Alvarez J; Storey B. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl.* 1994; 15:255–265.
 - Leboeuf B.; Restall B.; Salamon S.. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 68, 113-141.
 - Lovelock J.; Bishop M. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394–1395.
 - Maiorino M.; Bosello V.; Ursini F.; Foresta C.; Garolla A.; Scapin M. 2003. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans. *Biology of Reproduction* 68:1134-1141.

- Marti E; Marti J; Muño-Blanco T; Cebrián-Pérez J. 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl.* 29(4):459-67.
- McClean R.; Zee Y.; Holt W.; Johnston S. 2008. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 57(3):304-7.
- Medeiros A.; Gomes G.; Carmo M.; Papa F.; Alvarenga M. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58:273–6.
- Meizel, S. 1984. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biological Reviews*, 59: 125–157.
- Meseguer M.; Garrido N.; Simón C.; Pellicer A.; Remohí J. 2004. Concentration of Glutathione and Expression of Glutathione Peroxidases 1 and 4 in Fresh Sperm Provide a Forecast of the Outcome of Cryopreservation of Human Spermatozoa. *Journal of Andrology* 25(5):773-780.
- Meseguer M; de los Santos M; Simón C; Pellicer A; Remohí J; Garrido N. 2006. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril.* 86(5):1376-85.
- Morton K.; Evans G.; Maxwell W. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74:311-316.
- Morton K.M., Vaughan J.L., Maxwell W.M. 2008. Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 08/057. Project No. US-138A.
- Morton K.; Bathgate R.; Evans G.; Maxwell W. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(), 792-796.

- Niasari-Naslaji A.; Mosaferi S.; Bahmani N.; Gharahdaghi A.; Abarghani A.; Ghanbari A.; Gerami A. 2006. Effectiveness of a tris-based extender (SHOTOR diluent) for the preservation of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) semen. *Cryobiology* 53, 12-21.
- Noblanc A; Kocer A.; Chabory E.; Vernet P.; Saez F.; Cadet R.; Conrad M.; Drevet J. 2011. Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on Mammalian male fertilizing ability. *Journal of Andrology* 32(6):641-650.
- O'Connor M, Amann R. and Saacke R. 1981. Comparisons of Computer Evaluations of Spermatozoal Motility with Standard Laboratory Tests and their use for Predicting Fertility, *Journal of Animal Science*. 53:1368-1376.
- Oliphant, G., Reynolds, A. B. and Thomas, T. S. 1985. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.*, 174: 269–283.
- Okuda Y.; Seita S.; Hisamatsu S.; Sonoki M. 2007. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Experimental Animals* 56:29–34.
- Palencia D., Garner D., Hudig D., Holcombe D., Burner C., Redelman D., Fernandez G., Kam A., y. Powers J.1996. Determination of Activable Proacrosin/Acrosin in Bovine Sperm Using an Irreversible Isocoumarin Serine Protease Inhibitor', *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 55, 536-542.
- Partyka A; Yukaszewicz E; Nivaeski W. 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*. 77(8):1497-504
- Peña F; Saravia F.; Nuñez-Martínez I.; Johannisson A.; Wallgren M.; Martínez Rodríguez H. 2006. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. *Animal Reproduction Science*. 93: 101–113.

- Polge C, Smith A, Parkes A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature*. 164 (4172):666.
- Pommer A.; Rutllant J. And. Meyers S., 2003. Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions, *Biology of Reproduction*, 68, 1208–1214.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM.2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*; 339:62-6.
- Rasul Z.; Ahmad N.; Anzar M. 2001. Changes en la motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of búfalo spermatozoa. *Journal of Andrology* 23:125-132.
- Ratto M.; Wolter M.; Berland M. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. *Proceedings of the 2nd Congreso Mundial sobre Camelidos Cusco, Peru* p. 79.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM.2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. 37(6):e45.
- Saacke R. and White J. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th Tech., Conf. Artif. Insem. Repro&*, p. 22.
- Santiani A.; Huanca W.; Sapana R.; Huanca T.; Sepúlveda N.; Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology* 7 (3): 303–309.
- Sexton T. 1975. Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa. *Poultry science* 54:845–8.
- Shannon P. and Vishwanath R. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen

- bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Animal Reproduction Science* 39:1–10.
- Sherman J.; Bunge R. 1953. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 172, 767–768.
 - Smith, B. 1999. Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology*. pp. 191-196.
 - Spallanzani L. 1776. *Observatione e esperienze in torno ai vermicelli spermetici del' uomo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetatile opuscolo. II. Modena.*
 - Squires E.; Keith S.; Graham J. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62:1056–65.
 - Sumar J. 1983. *Studies on reproductive pathology in alpacas. Masters Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala and Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*
 - Sumar J. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*. vol.42, p.405-415
 - Tataje L. 2013. *Expresión testicular de ciclina A1 (CCNA1) en alpacas (Lama pacos). Tesis para optar el grado de magister, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú,*
 - Tataje L.; Canorio N.; Rudy L.; Suyo M.; Valdivia M. 2010. *Expresión testicular de hidroxiperoxidasa de fosfolípidos y ciclina A1 en Lama pacos y su correlación con motilidad y concentración espermática. Libro de Resumen de la XVIII Reunión Científica del ICBAR 45.*
 - Tiersch T.; Figiel C.; Wayman W. 2004. Cryopreservation of Sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow North American. *Journal of Aquaculture* 66: 8 – 14 .
 - Torres M; Laguna-Barraza R; Dalmases M; Calle A; Pericuesta E; Montserrat JM; Navajas D; Gutierrez-Adan A; Farré R. 2014. Male fertility is reduced by chronic intermittent hypoxia mimicking sleep apnea in mice. *Sleep*. 1;37(11):1757-65

- Tramer F; Rocco F; Micali F; Sandri G; Panfili E.1998. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 59(4):753-8.
- Valdivia M.; Canorio N.; Carrillo E.; Uipan P. 2005. Effects of cryoprotectants on Alpaca's spermatozoa during cooling process. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Biology of Reproduction, special issue. 24-27 .228.
- Vaughan J.; Galloway D.; Hopkins D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, ACT, Australia.
- Vilorio T; Meseguer M; Martínez-Conejero JA; O'Connor J; Remohí J; Pellicer A; Garrido N. 2010. Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defenses but does not cause oxidative DNA damage in infertile men. *Fertil Steril.* 94(2):631-7.
- Visconti P; Bailey J; Moore G; Pan D; Olds-Clarke P; Kopf G. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-1137)
- Visconti P, Galantino-Homer H, Moore G, Bailey J, Ning X, Fornes M, Kopf G. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology*; 19:242-248
- Vuthiphandchai V.; Chomphuthawach S.; Nimrat S.. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* 72(1):129-38.
- Waheed M; Gouda E; Khalifa T. 2013. Impact of seminal plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase on cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*.30.142 (3-4):126-30.
- Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction Fertility and Development* 7:871–891.
- Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60:481–92.

- Weir CP and Robaire B. 2007. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*. 28(2):229-40.
- Wheeler J.C. 1991. Origen, evolución y status actual. En: Avance y perspectivas de los camélidos sudamericanos. Ed. Saúl Fernández-Baca. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- WHO (World Health Organization). 2010. Laboratory manual Examination and processing of human semen. FIFTH EDITION. ISBN 978 92 4 154778 9.
- Willadsen S.; Polge C. Rowson L.; Moor R. 1976. Deep freezing of sheep embryos, *Journal of Reproduction and Fertility* 46:151-154.
- Williams C; Linch D; Watts M; Thomas N. 1997. Characterization of cell cycle status and E2F complexes in mobilized CD34+ cells before and after cytokine stimulation *Blood* 90 194–203
- Yang H.; Norris M.; Winn R.; Tiersch T. 2010. Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. *Cryobiology* 61(2):211-9.
- Yu I. & Leibo SP. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*. 57: 1179-1190.
- Zee Y; Holt W.; Gosalvez J.; Allen C.; Nicolson V. 2008. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 20(6):724-33.
- Zini A; Lamirande E Gagnon C.1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 16:183-188.

XII.-ANEXO

Tabla 1: Datos fisiológicos de las muestras de espermatozoides epididimarios de Alpaca, obtenidos previo al proceso de criopreservación (n=30).

No Ind.	Peso testicular		Tamaño del testículo		Concentración espermática inicial (10^6 /ml)	Motilidad espermática (%)	Viabilidad espermática (%)	Integridad de membrana (%)
	Der.	Izq.	Der.	Izq.				
Ind.1	13	14	4.8	5.1	90	48	57	63
Ind.2	14	14	4	4.3	45	52	63	75
Ind.3	14	13	5	4.8	90	47	55	72
Ind.4	14	15	4.5	4.6	97	55	70	70
Ind.5	14	15	4.7	4.8	97	55	70	70
Ind.6	15.5	15.3	5	5.2	732	60	80	71
Ind.7	15.2	15.3	5.4	5.5	86	75	71	49
Ind.8	14	14.2	5.6	5.3	400	90	66	68
Ind.9	14.5	15	4.8	5	500	80	60	76.
Ind.10	15	15.2	4.5	4.5	185	60	51	78
Ind.11	16	16.5	5	5	268	60	14	77
Ind.12	14	13	5	5	78	75	34	86
Ind.13	13	13.5	4	4	25	65	63	85
Ind.14	14	15	4	4	145	85	24	70
Ind.15	14	14	4	4	55	85	28	74
Ind.16	14	14	4	4	26	90	70	81
Ind.17	14.2	14.2	5	5	49	43	89	61
Ind.18	14	14	4.5	4.2	58	45	69	58
Ind.19	15	15	4.5	4.5	41	50	72	36
Ind.20	15.2	15.3	5	4.8	40	54	91	64
Ind.21	15.0	15.0	5.2	5.2	11	38	81	54

Ind.22	14.5	14.6	4.1	4.2	86	54	90	40
Ind.23	15	15	5.5	5.3	75	20	71	52
Ind.24	14.2	14.1	4.1	4.2	1	88	61	48
Ind.25	14.5	14.5	4.0	4.0	1	48	85	48
Ind.26	14.3	14.4	4.2	4.2	5	65	86	51
Ind.27	14.2	14.2	4.2	4.2	3	30	83	49
Ind.28	14.5	14.8	5.2	5.3	179	32	79	34
Ind.29	14.8	14.8	4.1	4.0	30	28	74	46
Ind.30	14	14	4.5	4.4	44	45	80	47

Tabla 2: Datos fisiológicos (motilidad, viabilidad e integridad de membrana) de los espermatozoides epidimarios de alpaca post congelamiento (n=30)

Individuo	Motilidad espermática (%)	Viabilidad espermática (%)	Integridad de membrana (%)
Ind.1	15.55	25	32
Ind.2	28	39	42
Ind.3	16.4	37	40
Ind.4	21.3	40	38
Ind.5	26.8	45	55
Ind.6	25.3	38	43
Ind.7	30.6	39	45
Ind.8	37.6	43	52
Ind.9	35.5	35	40
Ind.10	22.9	33	39
Ind.11	29.1	22	52
Ind.12	38.9	29	49
Ind.13	23.3	30	27
Ind.14	29.5	19	45
Ind.15	32.1	25	42
Ind.16	41	56	52
Ind.17	15.20	35	38
Ind.18	14.60	34	37
Ind.19	21.30	35	40
Ind.20	20.90	36	35
Ind.21	18.50	34	38
Ind.22	29.30	33	25
Ind.23	10.30	26	30
Ind.24	45.30	57	60
Ind.25	23.60	25	36
Ind.26	23.30	34	45
Ind.27	10.20	15	20
Ind.28	19.50	24	28
Ind.29	13.40	23	30
Ind.30	18.58	22	27

I.-Análisis estadístico realizado usando como variables la motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática entre los grupos de estudio (espermatozoides frescos, espermatozoides criopreservados).

A) Tipo de distribución de parámetros medidos (motilidad, viabilidad e integridad de membrana), se observa que todos los parámetros presentan una distribución normal Kolmogorov-Smirnov $Z \leq 0.05$

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MOVILIDAD	VIABILIDAD	INTMEMB
N		60	60	60
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	40.9972	49.5833	50.5833
	Std. Deviation	22.29639	22.77025	16.71424
Most Extreme Differences	Absolute	.138	.163	.116
	Positive	.138	.163	.116
	Negative	-.084	-.103	-.094
Kolmogorov-Smirnov Z		1.072	1.263	.900
Asymp. Sig. (2-tailed)		.201	.082	.392

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

B) Datos Generales de los parámetros evaluados.

TRATAMIENTO		MOTILIDAD	VIABILIDAD	INTEGRIDAD
FRESCOS	Media	.6357	.7753	.6807
	N	30	30	30
	Desviación estándar	.25738	.21897	.19221
	Std. Error of Kurtosis	.833	.833	.833
	Std. Error of Skewness	.427	.427	.427
	Media	.2500	.3373	.4067
	N	30	30	30
DESCONGELADOS	Std. Deviation	.09490	.10586	.10594

Std. Error of Kurtosis	.833	.833	.833
Std. Error of Skewness	.427	.427	.427

C) Según las pruebas estadísticas de ANOVA, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, se usó como variables la motilidad, viabilidad e integridad de membrana

ANOVA Table

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MOVILIDAD * TRATAMIENTO	Between Groups (Combined)	2.298	2	1.149	31.180	.000
	Within Groups	3.206	87	.037		
	Total	5.504	89			
VIABILIDAD * TRATAMIENTO	Between Groups (Combined)	3.029	2	1.515	54.452	.000
	Within Groups	2.420	87	.028		
	Total	5.449	89			
INTEGRIDAD * TRATAMIENTO	Between Groups (Combined)	1.136	2	.568	22.306	.000
	Within Groups	2.214	87	.025		
	Total	3.350	89			

Multiple Comparisons

Dependent Varial		(I) TRATAMIENT	(J) TRATAMIENT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
MOVILIDAD	Tukey HSI	FRESCOS	A 4C GRADOS	.13500*	.04956	.021	.0168	.2532
			DESCONGELAD	.38567*	.04956	.000	.2675	.5039
		A 4C GRADOS	FRESCOS	-.13500*	.04956	.021	-.2532	-.0168
			DESCONGELAD	.25067*	.04956	.000	.1325	.3689
		DESCONGELAD	FRESCOS	-.38567*	.04956	.000	-.5039	-.2675
			A 4C GRADOS	-.25067*	.04956	.000	-.3689	-.1325
VIABILIDAD	Tukey HSI	FRESCOS	A 4C GRADOS	.13200*	.04306	.008	.0293	.2347
			DESCONGELAD	.43800*	.04306	.000	.3353	.5407
		A 4C GRADOS	FRESCOS	-.13200*	.04306	.008	-.2347	-.0293
			DESCONGELAD	.30600*	.04306	.000	.2033	.4087
		DESCONGELAD	FRESCOS	-.43800*	.04306	.000	-.5407	-.3353
			A 4C GRADOS	-.30600*	.04306	.000	-.4087	-.2033
INTEGRIDAD	Tukey HSI	FRESCOS	A 4C GRADOS	.11533*	.04119	.017	.0171	.2136
			DESCONGELAD	.27400*	.04119	.000	.1758	.3722
		A 4C GRADOS	FRESCOS	-.11533*	.04119	.017	-.2136	-.0171
			DESCONGELAD	.15867*	.04119	.001	.0604	.2569
		DESCONGELAD	FRESCOS	-.27400*	.04119	.000	-.3722	-.1758
			A 4C GRADOS	-.15867*	.04119	.001	-.2569	-.0604

*. The mean difference is significant at the .05 level.

II.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y COMPARACIÓN DE DATOS DE FLUORESCENCIA OBSERVADOS PARA LAS PROTEÍNAS GPx1 (PATRÓN OBSERVADO PARA LA REGIÓN DE LA CABEZA)Y GPx4 (PATRÓN OBSERVADO PARA LA REGIÓN DE LA COLA)

FLUORESCENCIA PARA GPx1		
	ESPERMATOZOIDES FRESCOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
	70	38
	69	47
	78	36
	72	54
	67	34
	78	33
	65	32
	70	44
	79	64
	80	56
	70	57
	71	58
	62	49
	66	45
	77	50
	67	41
	72	42
	73	43
	68	44
	69	45
	76	46
	67	47
	71	48
	75	40
	73	41
	80	42
	71	43
	67	44
	66	45
	69	46
	74	49
PROMEDIO	71.35483871	45.25806452
DESVIACION STANDAR	4.729682069	7.184067237

FLUORESCENCIA PARA GPx4		
	ESPERMATOZOIDES FRESCOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
	65	38
	65	37
	66	26
	67	34
	68	34
	64	33
	63	32
	62	34
	61	24
	60	36
	59	37
	58	28
	57	25
	56	35
	65	35
	66	31
	63	32
	62	33
	61	34
	70	25
	75	36
	74	37
	73	38
	72	27
	71	31
	70	32
	69	33
	68	34
	67	35
	66	36
	60	29
PROMEDIO	65.25806452	32.61290323
DESVIACION STANDAR	4.957677278	3.948682258

A) Tipo de distribución del parámetro medido (fluorescencia en la región de la cabeza o en la cola), se observa que todos los parámetros presentan una distribución normal Kolmogorov-Smirnov $Z \leq 0.05$

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		GPx1 Fluorescencia	GPx4 Fluorescencia
N		90	90
Normal Parameters(a,b)	Mean	.6724	.5752
	Std. Deviation	.16157	.17953
Most Extreme Differences	Absolute	.181	.210
	Positive	.115	.182
	Negative	-.181	-.210
	Kolmogorov-Smirnov Z	1.715	1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)		.006	.001

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

B) Según la prueba estadística de ANOVA se encontró diferencias significativas entre los grupos de estudio, se usó como variable la fluorescencia en la región de la cabeza (GPx1) y la fluorescencia en la región de la cola (GPx4).

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GPx1Fluor es	Between Groups	1,584	1	1,584	267,878	,000
	Within Groups	,343	58	,006		
	Total	1,927	59			
GPx4Fluor e	Between Groups	2,166	1	2,166	674,356	,000
	Within Groups	,186	58	,003		
	Total	2,352	59			

III.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL GEN *gpx4* Y LA MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y CRIOPRESERVADOS.

INDIVIDUO	EXPRESIÓN RELATIVA A NIVEL TESTICULAR DEL GEN GPx4
Ind. 1	2.34
Ind. 2	4.42
Ind. 3	2.01
Ind. 4	3.57
Ind. 5	4.15
Ind. 6	3.82
Ind. 7	3.18
Ind. 8	6.8
Ind. 9	4.89
Ind. 10	4.53
Ind. 11	5.12
Ind. 12	7.39
Ind. 13	3.7
Ind. 14	7.5
Ind. 15	5.6
Ind. 16	7.15
Ind.17	2.34
Ind.18	5.42
Ind.19	6.01
Ind.20	5.57
Ind.21	5.15
Ind.22	4.82
Ind.23	3.08
Ind.24	3.18
Ind.25	0.09
Ind.26	4.89
Ind.27	3.15
Ind.28	2.32
Ind.29	0.22
Ind.30	1.2

A) Análisis estadístico de correlación entre datos, usando el test de Correlación de Spearman.

Correlaciones

			Expresión relativa	Movimiento espermatozoides frescos	Movimiento espermatozoides descongelados
Coeficiente rho de Spearman	Expresión relativa de	Coeficiente de	1.000	.607(**)	.550(**)
		Correlación			
		Sig. (2-tailed)	.	.000	.002
		N	30	30	30
	Movimiento espermatozoides frescos	Coeficiente de	.607(**)	1.000	.910(**)
		Correlación			
		Sig. (2-tailed)	.000	.	.000
		N	30	30	30
	Movimiento espermatozoides descongelados	Coeficiente de	.550(**)	.910(**)	1.000
		Correlación			
		Sig. (2-tailed)	.002	.000	.
		N	30	30	30

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Research Article

Open Access

**NEW CRYOPROTECTANTS SUITABLE FOR SLOW FREEZING
PROCESS OF EPIDIDYMAL SPERMATOZOA OF ALPACA
(*Lama pacos*)**

Nadia Canorio^{1*}, Fernando Paredes¹, Martha Valdivia^{1}**

¹Laboratory of Animal Physiology Reproduction, Faculty of Science Biology, University of San Marcos

Received: December 9, 2014 / Accepted : January 24, 2015

© Science Research Library

Abstract

Cryopreservation of sperm is a technique of assisted reproduction that cause changes and damage to mitochondria, acrosome and tail of sperm, for that reason, a suitable methodology of freezing is necessary. The objective of this study was to use new cryoprotectants suitable for freezing epididymal spermatozoa of Alpaca (*Lama pacos*) in a slow freezing method. The epididymides of alpaca were transported from Huancavelica city to our laboratory at 4°C in physiological solution. The sperm cells were extracted from the epididymis fourteen hours later in HAMF10 medium. The YoLK-Citrate medium with the cryoprotectants: Dimethyl sulfoxide (0.5M, 0.25M, 0.125M) and Dimethylacetamide (0.75M, 0.385M, 0.18M) were used for the cryopreservation, and were compared with a control group cryopreserved with Glycerol (0.6M). The stabilization period was one hour to 4°C. The slow freezing was done with the use of a programmable biofreezer with the Cryogenesis 4.1 computer software until the temperature reached -80°C and finally the samples were transferred to liquid nitrogen to -196°C. After the thawing process the differences between the results of viability and membrane integrity were significant; in the case of motility we found two groups: one group consisting by Me₂SO₄ 0.25M, Me₂SO₄ 0.5M, DMA 0.375M and DMA 0.75M in this group the highest motility values were obtained; and the second group consisted by Me₂SO₄ 0.5M, 0.18M DMA and Glycerol 0.6M where values were the lowest. Cryoprotective agents DMA (0.375M and 0.75M) and Me₂SO₄

(0.25M and 0.5M) had an effective cryoprotectant effect compared to the control sample (Glycerol 0.6M).

Keywords: Alpaca, sperm cryopreservation, dimethylacetamide, dimethyl sulfoxide

*Nadia Canorio (Corresponding author):

E-mail: ncanorio@gmail.com

Martha Valdivia (Co-corresponding author, if any):

E-mail: marthavaldiviacuyagmil.com

Introduction

Alpaca is an important South American camelid, most of these species live in the Peruvian Andes; the difficulties that confront alpaca breeders in the Andes are the lack of use of reproductive technologies. Semen cryopreservation of south American camelids is limited because the semen generally is poor quality, highly viscous making difficult its use, and the cryopreservation has not been well developed (Bravo et al. 2000c). The results generally of 6 – 20 % post-thaw motility (Vaughan et al. 2003a; Santiani et al. 2005); rarely exceed 40 %. Although, post thaw motility in excess of 45 % has been reported by Bravo et al. (1996) however, the details provided by the authors are not sufficient to allow replication of methods.

In recent years, there has been an interest in cryopreservation of epididymal sperm of alpaca from the epididymides of dead animals, whose handling in the laboratory is much more satisfactory and allowed to obtain samples with good

concentration of mature sperm. In a recent work (Morton et al, 2010) reported some interesting differences between medias used for cryopreservation depending on sample source (ejaculate or epididymis), in that work physiological differences were observed between these two groups, especially in their plasma membrane properties that affect sperm survival after cooling and freezing (Watson et al, 1995, Yu et al. 2002). consequently, the improvement of existing protocols of freezing for epididymal sperm of alpaca is necessary.

Generally, the low quality of frozen-thawed sperm is attributed to the cryoprotectant used; most of works about cryopreservation of alpaca sperm has employed glycerol with a concentration of 6 - 7 %, however, post thaw results show a poor recovery after thawing, accompanied by the loss of the initial motility (pre-freezing) during cryopreservation (Vaughan et al. 2003, Valdivia et al. 2005, Santiani et al. 2005), an efficient method of epididymal sperm cryopreservation has been developed recently which utilizes a final glycerol concentration of 3 % (Morton et al. 2007), but despite its benefits, glycerol is potentially cytotoxic to some concentrations (Almilid et al. 1988; Holt et al. 2000; Watson et al. 2000), and has a contraceptive effect in some species such as dogs (Hay et al. 1997).

Few studies have focused on alternative cryoprotectants for sperm cryopreservation of alpaca ; stimulating research about use of new cryoprotectant agents such as N,N-dimethylacetamide (DMA) and dimethylsulfoxide (Me_2SO_4) (Ball et al., 2001; Lovelock et al., 1959), they are good candidates due to its highly hydrophilic nature and low molecular weight, DMA has been used in the cryopreservation of sperm of birds (Blanco et al. 2000), mammals such as koala and kangaroo (McClean et al. 2008), and is the most common cryoprotectant agent in sperm cryopreservation of fishes.

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of DMA and Me_2SO_4 such as cryoprotectants during the slow freezing process of epididymal sperm of alpaca.

Materials and methods

1. Animals

We used a total of thirty male alpacas, aged between 4 and 7 years old. These animals were slaughtered at the local slaughterhouse in Huancavelica city. Testicles were collected with their scrotum under hygienic conditions and transported to our laboratory within 14 hours in an ice tank with a temperature ranged between 4-8 °C using water bags.

2. Reagents and media

Chemicals used were of analytical grade and, as far as possible, cell culture tested by the manufacturer. All media components were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)

3.-Sample Collection

In laboratory, we proceeded to isolate the region of cauda from epididymis, which was cleaned and released of residual blood vessels, then was cut into small pieces to allow exit of sperm in saline solution (0.9% NaCl) at 37 ° C. Sperm sample were finally centrifuged and resuspended in Ham F 10 medium (SIGMA Catalogue number N6635) at 37° C, finally we recovered the proportion of the motile and morphologically normal sperm, then we evaluated the concentration, viability, motility and membrane integrity.

4.-Concentration, motility, viability and plasma membrane integrity

Concentration was evaluated by diluting 10 µL from fresh sperm sample with 90 µL of water, 10 µL of this solution was placed then on each side of a haemocytometer (Improved Naebauer, Weber, London U.K.).

Motility was evaluated subjectively by placing a 10-µL aliquot of resuspended sperm sample on a pre-warmed sheet and covered by pre-warmed lamella, as was described by Evans and Maxwell (1987) and then observed in a light microscopy

Viability was evaluated using a vital dye eosin Y, where a drop of sample was incubated with a drop of dye at 37 ° C for five minutes and then was proceeded to the counting of patterns presented, colorless sperm: sperm alive and orange sperm: dead sperm. Plasma membrane integrity was evaluated by the hypo-osmotic swelling test (Jeyendran et al. 1984), which consisted on incubating 100µl of the sample with 900µl of hypo-osmotic media (7.35g of sodium citrate and 13.51g of fructose 1000 ml, 150 mOsm/kg), and were incubated at 37°C for 30 min. It was evaluated by microscopy, sperm were classified according to the presence or absence of swelling in the tail region (Sperm with coiled flagellum: sperm with intact plasma membrane; sperm with straight flagellum, no curvature of any kind: sperm with altered plasma membrane).

5.-Experimental design:

We chose several concentrations of every cryoprotectants with the guidance on previous works of our laboratory (Valdivia et al., 2003). In the first tests we evaluated cryoprotectants such as: dimethylsulfoxide, propilenglicol, glycerol and dimethylacetamide on several concentrations, we obtained disappointing results because of in case of glycerol and propilenglycol (1.5M, 1M, 0.5M and 0.25M) was not found any motile sperm and the

viability and plasma membrane integrity were inferior to 30% (results not showed); in case of others such as cryoprotectants, dimethylsulfoxide and dimethylacetamide on concentrations of 2M, 1.5M y 1M found a post thawing motility of 10% and the others parameters (Viability and integrity plasma membrane) with values of 50%, for that reason we proceed to prove others concentrations such as: 0.5M, 0.25M and 0.125M to dimethylsulfoxide and 0.75M, 0.375M and 0.18M to dimethylacetamide.

For this work, all the samples were divided in three groups: One group was cryopreserved with Glycerol 3% (control group), other group was cryopreserved with dimethyl sulfoxide (0.5 M, 0.25 M, and 0.125 M) and the last was cryopreserved with Dimethylacetamide (0.75M, 0.375M and 0.18M), at the end, we obtained four straws of 0.25ml for every concentration of each cryoprotectants.

6. – Cryopreservation process

Media used for cryopreservation was Tes Tris Yolk egg which included sodium citrate 5% solution (SIGMA, code D1546), Test solution 2% (SIGMA code T1375), Trizma Base 8% solution (SIGMA code T6066), egg yolk 20%; the final solution was supplemented with streptomycin and penicillin (1:1000). This final solution was supplemented with cryoprotectants: Dimethylacetamide (DMA) at concentrations of 0.75M, 0.375M and 0.18M; Dimethylsulfoxide (Me_2SO_4) to concentrations of: 0.5 M, 0.25 M and 0.125 M and Glycerol (G) to concentration of 0.6M ($\approx 3\%$).

For freezing, all samples were prepared to 20×10^6 sperm/ ml, methodology of freezing was slow. The washed sample was mixed with a proportion of 1:1 with Tes Tris Yolk supplemented with cryoprotectant agent. The final mixture was kept at 4 °C for one hour, then the samples were placed in cryopreservation straws of 250 μl , sealed and placed in programmable biofreezer, where the temperature and velocity of freezing were controlled by CryoGenesis 4.1 software.

The freezing protocol was as follows: The initial temperature was 4 °C for five minutes, the second period was the decrease in temperature of 4 °C to -2 °C at a rate of 3 °C/min and maintained in -2 °C for one minute. After we proceeded to do seeding by touching the straw away from the sample with a pre-cooled metal rod until it saw a slight change of color on the walls of the straws, a pause of 5 min was imposed to ensure that seeding was complete and equilibrium restored. The third period was from 2 °C to -30 °C with a freezing rate of 5 °C per minute and finally -30 °C to

-80 °C with a freezing rate of 8 °C/minute. After this point, we put straws in liquid nitrogen at -196 °C.

The samples were thawed at 50°C for seven seconds after have been storage for 72 h in liquid nitrogen, and then the thawed sample was centrifuged (300 g; 10 min), the pellet obtained was resuspended in 0.5 mL media HAM F1 and maintained at 37°C for 10 minutes, after that we proceed to evaluate the motility, viability and plasma membrane integrity.

8.-Statistical analysis

The values found in routine evaluation of fresh and thawed sperm were analyzed by ANOVA after making a transformation of the data with arc-sen, and comparisons were rejected by the non-parametric statistical analysis (Tukey test), differences were considered significant when $p < 0.05$. Results were expressed as media \pm standard deviation (SD). Analyses were performed using SPSS (version 17.00 for Windows).

Results and discussion

Cryopreservation of alpaca semen has had a poor success compared with other domestic livestock species (Vaughan et al. 2003a; Santiani et al. 2005); the recent use of epididymal sperm models has been used to further highlights in the physiology of sperm cell from semen. In the present work we evaluated possible new cryoprotectants Me_2SO_4 and DMA to use in the slow freezing process of epididymal sperm of alpaca; all the results were compared with a control sample, with glycerol to an adequate concentration (Morton et al., 2007).

We worked with epididymal sperm obtained after 14 hours post mortem and used Tes Tris Yolk for cryopreservation process, this media has been used in other species such as bull (Vishwanath and Shannon 2000), elk (Leboeuf et al. 2000), ram (Evans and Maxwell 1987), alpaca (Vaughan et al. 2003), camel (Niasari-Naslaji et al. 2006) and llama (Ratto et al. 1999).

In this study, the cooling rate was found between 4-7 °C/min, the points during slow cooling were: +4 °C, -2 °C, -30 °C and -80 °C (Willadsen et al. 1976, Curry et al. 1994), and finally stored at -196 °C (liquid nitrogen), thawing consisted on 50 °C for 7 seconds.

Glycerol (at a concentration of 3%) is the most commonly used cryoprotectant (CPA) for alpaca sperm (Morton et al. 2007), but it produce toxic effects as well as contraceptive effects on cooled sperm from other species (Holt et al., 2000), its behavior during freezing process depends on cooling rate (Slow, fast or ultra-fast).

Our result post thaw survival (results not showed) with glycerol in several concentrations (1.5M, 1M, 0.5M and 0.25M) in slow freezing process were very deficient; a motility of 1% and the viability and plasma membrane integrity were inferior to 40%; for that reason we proceed to prove other cryoprotectants like N,N-dimethylacetamide (DMA) and dimethyl sulfoxide (Me₂SO₄), they are good candidates due to its highly hydrophilic nature, low molecular weight and their level of toxicity is minor compared with the level of glycerol; DMA reduces the formation of intracellular ice crystals and increases membrane permeability, thus decreasing osmotic damage (Ball et al., 2001); the penetration of Me₂SO₄ is also rapid due to its lower molecular weight relative to glycerol (Lovelock et al., 1959) and it has been used to successfully cryopreserved sperm in other species (Kundu et al., 2000).

Our initial sample showed a concentration average of 128.5×10^6 sperm, a motility of $77.25 \pm 5\%$, a viability of $72.45 \pm 4.2\%$ and plasma membrane integrity of $63.15 \pm 5.2\%$; after keeping the samples at 4 ° C with media Yolk Tes Tris supplemented with cryoprotectant agents at different concentrations, we proceeded to evaluate the different parameters of motility, viability and integrity of the plasma membrane, the table No. 1 shows the results obtained, which shows that the best results in the evaluated parameters were found when we used: DMA 0.75M, 0.375M, and 0.18M ($P < 0.05$, Table 1).

Table 1: Results obtained after the stabilization period at 4 ° C for one hour using Tris tes egg Yolk media supplemented with cryoprotectants at different concentrations.

CRYOPROTECTANT	PARAMETERS		
	Progressive motility (%)	Viability(%)	Intact plasma membrane(%)
DMA 0.18M	56.36±4.33 ^a	69.28±3.72 ^a	64.02±3.52 ^a
DMA 0.375M	55.09±3.21 ^a	75.15±3.02 ^b	72.81±3.21 ^b
DMA 0.75M	52.69±5.68 ^a	76.03±4.84 ^b	67.28±2.95 ^a
Me ₂ SO ₄ 0.125M	52.47±5.85 ^a	68.47±4.51 ^a	64.17±2.82 ^a
Me ₂ SO ₄ 0.25M	42.77±4.53 ^b	63.65±3.61 ^c	61.75±2.54 ^a
Me ₂ SO ₄ 0.5M	34.61±4.51 ^b	60.69±3.42 ^c	63.71±3.12 ^a
Glycerol 0.6M	35.25±3.07 ^b	62.65±3.70 ^c	61.75±3.64 ^a

Data are presented as mean ± standard deviation .Values with different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$), Where DMA: Dimethylacetamide, Me₂SO₄: Dimethyl sulfoxide

After the cooling process, the samples were thawed at 50 °C for seven seconds, centrifuged and resuspended the pellet in HAM F1 medium and maintained at 37 ° C for 10 minutes, then, we

proceeded to evaluate the different parameters. Our post thaw results showed a decrease in parameters of motility, viability and membrane integrity, being the most affected motility, as reported other authors (Watson 1995), our results are showed in the table No. 2. Our results of membrane integrity and viability were highest when the cryoprotectant agent used was DMA 0.375M; in the case of mobility variable, two groups were observed: a group formed by Me₂SO₄ 0.5M, Me₂SO₄ 0.25M, DMA 0.75M and DMA 0.375M with which we obtained the highest mobility values ; and the second group formed by Me₂SO₄ 0.125M, DMA 0.18M and glycerol 0.6M where the values were lower ($p < 0.05$).

In this work, we used DMA in adequate concentrations, these concentrations were also tested in other species such rabbit (Dalimata and Graham 1997, Okuda et al., 2007), wild boar (Kim et al., 2011) turtle, fish (Tiersch et al. 2004 Vuthiphandchai et al. 2009, Yang et al. 2010), kangaroo (McClean et al. 2008), horse (Medeiros et al. 2002, Squires et al. 2004) and koala (Zee et al. 2008, Johnston et al . 2012) where they used concentrations between 0.25 M-1.25M, finding post thawing motility values was 45%, viability was 58%, and plasma membrane integrity was 60%.

Table 2: Results obtained after the process of freezing/thawing in the presence of different concentrations of cryoprotectants.

CRYOPROTECTANT	PARAMETERS		
	Progressive motility (%)	Viability(%)	Intact plasma membrane(%)
DMA 0.18M	26.99±1.42 ^a	40.50±2.56 ^a	45.44±11.99 ^a
DMA 0.375M	34.44±1.41 ^b	60.92±3.95 ^b	64.38±1.66 ^b
DMA 0.75M	28.63±4.70 ^b	45.74±1.81 ^c	52.54±8.19 ^c
Me ₂ SO ₄ 0.125M	22.23±6.13 ^a	46.88±6.76 ^d	46.24±11.78 ^a
Me ₂ SO ₄ 0.25M	33.33±4.85 ^b	48.74±2.23 ^d	52.24±1 ^d
Me ₂ SO ₄ 0.5M	27.86±5.29 ^b	50.30±4.98 ^d	51.64±4.3 ^c
Glycerol 0.6M	17.56±2.66 ^a	35.52±3.78 ^e	40.53±2.68 ^a

Data are presented as mean ± standard deviation .Values with different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$), Where DMA: Dimethylacetamide, Me₂SO₄: Dimethyl sulfoxide.

In the case of Me₂SO₄, this agent has been used in various species such as goats (Kundu et al. 2000), colorado Wolf (Johnson et al. 2014), fish (Anchordoguya et al. 1988 Thirumala et al. 2005 Thirumala et al. 2006 Vuthiphandchai et al. 2009, Sanches et al. 2013), pig (Hood et al. 1970), horse (Devireddy et al. 2002), and human (Serafini et al. 1986.) where they used concentrations between 0.5M-1.5M, finding post

thawing motility of 35%, viability 59%, and plasma membrane integrity 50%.

In the case of glycerol we didn't obtained satisfactory results, one possible reason for that is may be the molecular characteristics of glycerol during the freezing process, because glycerol is a good cryoprotectant in rapid freezing process due to the high viscosity that showed during the freezing process, similar behavior showed the sugars (high viscosity) and the optimal cooling rate with glycerol could be in the range of 10-50°C/min. These characteristics: toxicity, contraceptive action and behavior during freezing process; have stimulated the study of alternative CPAs in slow freezing process of alpaca epididymal sperm cells.

The results that is showed in the present work represent the final result of several previous works and they are comparable with the results of similar works made by other researchers (Santiani et al. 2006, Valdivia et al. 2003 and Morton et al. 2010); this is the first work with slow freezing process with new cryoprotectants (DMA and Me₂SO₄) and represents a good alternative in the field of reproductive biotechnology in alpaca spermatozoa, there is no doubt that improvement of cryopreservation techniques of alpaca spermatozoa will contribute to the program development of genetic improvement in these species and probably may be applied in others South American camelids such as llama and vicuña.

Acknowledge This research was supported by The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology ICGEB Grant CRP/ PER03-01 Molecular Analysis of alpacas gametes interactions.

References

- Almild T. & L.A. Johnson. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim.* 66:2899-905
- Anchordoguya T., J. Crowe, F. Griffin & W. Clark. 1988. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology* 25: 238-243
- Ball BA., V. Medina, C.G. Gravance & J. Baumber. 2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589.
- Blanco J., G. Gee, D. Wildt & A. Donoghue. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Journal of Biology of Reproduction* 63(4):1164-71
- Bravo P.W., C. Ordóñez & V. Alarcón. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. In: 13th ICAR, Sydney, Australia.
- Bravo P.W., M. Ccallo & J. Garnica. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Rumin. Res.* 38, 91-95
- Curry MR., J.D. Millar & P.F. Watson. 1994. Calculated Optimal Cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation fail to conform with empirical observations. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 51, 1014-1021.
- Dalimata A.M. & J.K. Graham. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 49: 831-841.
- Devireddy R.V., D.J. Swanlund, T. Olin, W. Vincente et al. 2002. Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates in the Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry. *Biology of Reproduction* 66:222-231
- Evans G. & W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney, Australia.
- Hay M.A., W.A. King, C.J. Gartley, S.P. Leibo & K.L. Goodrowe. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 51:99-108.
- Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62: 3-22.
- Hood R. D., C. W. Foley & T. G. Martin. 1970. Effects of Cold Shock, Dilution, Glycerol and Dimethyl Sulfoxide on Cation Concentrations in Porcine Spermatozoa. *Journal of Animal Science* 30:91-94.
- Jeyendran R.S., H.H. Van der Ven & M. Perez-Pelaez. 1984. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sperm characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70,219-228.
- Johnson A.E., E.W. Freeman, D.E. Wildt & N. Songsasen. 2014. Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hyper-sensitivity to osmotic and freezing-induced injury, but respond

- favorably to dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 68(3):361-70.
- Johnston S.D. , Y.P. Zee, C. López & J. Gosálvez. 2012. The Effect of Chilled Storage and Cryopreservation on the Sperm DNA Fragmentation Dynamics of a Captive Population of Koalas. *Journal of Andrology* 33(5):231-240.
- Kim S., Y.J. Lee, D.B. Ji & Y.J. Kim. 2011. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *Journal of Veterinary Medicine Science* 73(7):961-3.
- Kundu C. N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh & G.C. Majumder. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40: 117–125
- Leboeuf B., B. Restall & S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 68, 113-141.
- Lovelock J. E. & M. W. Bishop. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394–1395.
- McClean R., Y.P. Zee, W.V. Holt & S.D. Johnston. 2008. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 57(3):304-7.
- Medeiros A.S.L., G.M. Gomes, M.T. Carmo, F.O. Papa & M.A. Alvarenga. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58:273–6.
- Ministerio de Agricultura Del Perú. 2004. "Informe anual de crianzas altoandinas". Vol 2, 95p.
- Morton K., R. Bathgate, G. Evans & W. Maxwell. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(), 792-796.
- Morton K., G. Evans & W. Maxwell. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74:311-316.
- Niasari-Naslaji A., S. Mosafari, N. Bahmani, A. Gharahdaghi, A. Abarghani, A. Ghanbari & A. Gerami. 2006. Effectiveness of a tris-based extender (SHOTOR diluent) for the preservation of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) semen. *Cryobiology* 53, 12-21.
- Okuda Y., S. Seita, S. Hisamatsu, M. Sonoki et al. 2007. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Experimental Animals* 56:29–34.
- Ratto M.H., M. Wolter & M. Berland. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. *Proceedings of the 2nd Congreso Mundial sobre Camelidos* Cusco, Peru p. 79.
- Sanches E.G., I.R. Oliveira, P.C. Serralheiro & V.R. Cerqueira. 2013. Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(3):1083-1091
- Santiani A., W. Huanca, R. Sapana, T. Huanca, N. Sepúlveda & R. Sánchez. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology* 7 (3): 303–309.
- Serafini P.C., D. Hauser , D. Moyer & R.P. Marrs. 1986. Cryopreservation of human spermatozoa: correlations of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona-free hamster ova. *Fertility and Sterility* 46(4):691-695
- Squires E.L., S.L. Keith & J.K. Graham. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62:1056–65.
- Thirumala S., C. Huang, Q. Dong, T. Tiersch & R. Devireddy. 2005. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Theriogenology* 63: 2395-2415
- Thirumala S., W.T. Campbell, M.R. Vicknair, T.R. Tiersch & R.V. Devireddy. 2006. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology* 66:964–973
- Tiersch T. R., C.R. Figiel & W.R. Wayman et al. 2004. Cryopreservation of Sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow North American. *Journal of Aquaculture* 66: 8 – 14 .
- Valdivia M., I. Manosalva, J. Quispe, et al. 2003. 'Effects of permeating cryoprotectants on survive and motility in alpaca spermatozoa. *Biology of Reproduction* 68:279-280.
- Valdivia M., N. Canorio, E. Carrillo & P. Uipan. 2005. Effects of cryoprotectants on Alpaca's spermatozoa during cooling process. *Biology of Reproduction special issue* 73:228.


- Vaughan J.L., D. Galloway & D. Hopkins. 2003. Artificial insemination in alpacas (Lama pacos). Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, ACT, Australia.
- Vishwanath R. & P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* 62:23-53
- Vuthiphandchai V., S. Chomphuthawach & S. Nimrat. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* 72(1):129-38.
- Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction Fertility and Development* 7:871-891.
- Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60:481-92.
- WHO (World Health Organization). 2010. Laboratory manual Examination and processing of human semen. FIFTH EDITION. ISBN 978 92 4 154778 9.
- Willadsen S.M, C. Polge, L.E.A. Rowson & R.M. Moor. 1976. Deep freezing of sheep embryos, *Journal of Reproduction and Fertility* 46:151-154.
- Yang H., M. Norris, R. Winn & T.R. Tiersch. 2010. Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. *Cryobiology* 61(2):211-9.
- Zee YP, W.V. Holt, J. Gosalvez, C.D. Allen, V. Nicolson et al. 2008. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 20(6):724-33.

Science Research Library follows
 OPEN ACCESS POLICY
 LEARN. SHARE. ADVANCE.

Science Research Library (SRL) Open Access Policy

SRL publishes all its journals in full open access policy, enables to access all published articles visible and accessible to scientific community.

SRL publishes all its articles under Creative Commons Attribution - Non-Commercial 4.0 International License



Authors/contributors are responsible for originality, contents, correct references, and ethical issues.

Author benefits:

- ✓ Online automated paper status
- ✓ Quality and high standards of peer review
- ✓ Rapid publication
- ✓ Open Access Journal Database for high visibility and promotion of your research work
- ✓ Inclusion in all major bibliographic databases
- ✓ Access articles for free of charge